

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
29. Dezember 2004 (29.12.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/113370 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C07K 14/02**,  
G01N 33/53, A61K 39/29

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/006516

(22) Internationales Anmeldedatum:  
17. Juni 2004 (17.06.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
103 28 139.8 20. Juni 2003 (20.06.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): **DADE BEHRING MARBURG GMBH [DE/DE]**;  
Emil von Behring Strasse 76, 35041 Marburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **KRUPKA, Udo**  
[DE/DE]; Blaue Hofstadt 21, 35043 Marburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,  
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,  
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,  
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,  
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,  
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,  
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: NOVEL SURFACE PROTEIN (HBsAg) VARIANT OF HEPATITIS B VIRUS

(54) Bezeichnung: NEUE OBERFLÄCHENPROTEIN-(HBsAg-) VARIANTE DES HEPATITIS B VIRUS

Aminosäuresequenz der HBsAg a-Determinante der verschiedenen HBV Genotypen  
im Vergleich zur neuen Variante HDB 11  
Für jeden Genotyp wurde ein repräsentatives Genom zu Grunde gelegt und die aa-Sequenz aus der Nukleotidsequenz abgeleitet  
A: X70185; B: DQ0331; C: X01587; D: X72782; E: X75664; F: X75663; G: FR1  
(Stuyver et al.; J. Gen. Virol. 81: 67-74 (2000); Norder et al.; J. Gen. Virol. 73: 3141-3145 (1992))

aa #	101	111	121	131	141	151	161	170
Genotyp								
A	QGMLPVCPLI	PGSTTTSTGP	CKTCITPAQO	NSMFPSCCCT	KPTDGNCTCI	PIPSSWAFK	YLWEWASVRF	
B	-----S-----	-----T-----	-----T-----	-----S-----	-----R-----	-----G-----	-----A-----	
C	-----L-----	-----TS-----	-----I-----	-----T-----	-----S-----	-----G-----	-----F-----	
D	-----S-----	-----R-----	-----T-----	-----Y-----	-----S-----	-----G-----	-----F-----	
E	-----S-----	-----R-----	-----M-----	-----T-----	-----S-----	-----G-----	-----F-----	
F	-----S-----	-----L-----	-----T-----	-----S-----	-----S-----	-----L-----	-----G-----	

HDB 11  
--I-----ALNNR-Q-K-----T-H- T--Y-Y-----S-----G- F-----A--  
(R)

aa #	183	114	128	129	136	143	159	168
------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

CC  
Pein hervorgehoben sind die Aminosäure-Substitutionen, die von dem Wildtyp HBV Genotyp D, ayw2 abweichen

AA... AMINO ACID SEQUENCE OF THE HBsAg A DETERMINANT OF  
THE VARIOUS HBV GENOTYPES AS COMPARED TO THE NOVEL  
VARIANT HDB 11  
EVERY GENOTYPE WAS BASED ON A REPRESENTATIVE GENOME  
AND THE AA SEQUENCE WAS DERIVED FROM THE NUCLEOTIDE  
SEQUENCE

BB... GENOTYPE  
CC... PRINTED IN BOLD FACE ARE THE AMINO ACID  
SUBSTITUTIONS THAT DEVIATE FROM THE WILD-TYPE HBV  
GENOTYPE D, AYW2

(57) Abstract: The invention relates to sequences of a novel variant of the Hepatitis B surface antigen (HBsAg) and to methods for  
detecting, in patient samples, nucleic acids, antigens and antibodies directed against the same.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Sequenzen einer neuen Variante des Hepatitis B surface Antigens (HBsAg) und  
Methoden zum Nachweis von Nukleinsäuren, Antigenen und dagegen gerichteten Antikörpern in Patientenproben.

WO 2004/113370 A1



**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

**Neue Oberflächenprotein- (HBsAg-) Variante des Hepatitis B Virus**

Die Erfindung betrifft Sequenzen einer neuen Variante des Hepatitis B surface Antigens (HBsAg) und Methoden, diese Genom- und Protein-Variante sowie dagegen gerichtete Antikörper aus Patientenproben zu detektieren.

Die neuen Sequenzen führen zu 11 im Stand der Technik noch nicht bekannten Aminosäure-Austauschen in dem Hepatitis B surface Antigen (HBsAg) in den Aminosäurepositionen 96 bis 136 der Aminosäuresequenz des surface Antigens, wobei sich 10 Substitutionen in der Region der a-Determinante befinden (aa 101 bis aa 180)

Die Erfindung betrifft auch immunchemische Nachweisverfahren zum gleichzeitigen Nachweis dieser neuen HBV - Variante zusammen mit bekannten Varianten/Subtypen sowie die Verwendung der neuen Sequenzen in Verbindung mit bekannten Sequenzen zum gleichzeitigen Nachweis von HBV-spezifischen Antikörpern. Die Antigen bzw. Antikörper-Bestimmungen können jeweils in einem Testansatz differenzierend oder nicht-differenzierend durchgeführt werden.

Schließlich betrifft die Erfindung auch den Nachweis der entsprechenden Nukleinsäuren mit Hilfe sogenannter Nukleinsäure-Tests (z.B. Polymerase Chain Reaction, PCR) mit Hilfe geeigneter Primer sowie die Verwendung der neuen Aminosäuresequenzen zur Erzeugung von Impfstoffen.

Das Hepatitis B Virus ist bekanntermaßen der Auslöser einer Vielzahl von Erkrankungsverläufen von milden inapparenten Infektionen bis hin zu chronisch aktiven und fulminant verlaufenden durch virale Infektionen ausgelösten Leberentzündungen (Virushepatitiden).

Die chronische Infektion mit HBV stellt mit geschätzten 400 Millionen betroffenen Menschen ein globales Gesundheitsproblem dar (Lee, N. Engl. J. Med. 337; 1733-1745 (1997)).

Als geeignetste Prophylaxe für die weltweit häufig anzutreffende HBV-Infektion gilt die aktive Immunisierung (Stimulation der Antikörperantwort durch Antigengabe) und auch die passive Immunisierung (durch Injektion präformierter Antikörper).

Das HBV gehört zu den Hepadna-Viren und stellt ein Viruspartikel mit einem Durchmesser von 42 nm dar, das aus Kern und Hülle besteht. Das Genom des Virus ist eine doppelsträngige, ringförmige DNA- Sequenz von etwa 3200 Nukleotiden, die mindestens sechs verschiedene virale Gene kodieren (Tiollais et al., Nature 317: 489-495 (1985)). Es liegen vier offene Leserahmen für die Bildung der viralen Proteine vor.

Im S-Gen liegt die Information für das HBV surface Antigen (HBsAg), das auch small protein (S) genannt wird. Daneben gibt es auch größere Formen, die als large protein (L) und middle protein (M) bezeichnet werden.

Allen drei Proteinen gemeinsam ist die 226 Aminosäuren umfassende S-HBsAg Sequenz (Gerlich et al., Viral Hepatitis and Liver Disease, Hollinger et al., William-Wilkins, Baltimore, MD, pages 121-134 (1991)).

Die Proteinregionen vor dem small HBs werden auch Pre-S1 und Pre-S2 bezeichnet, umfassen 108 bzw. 55 Aminosäuren und sind beide in dem L-Protein (389 Aminosäuren) enthalten, während das M-Protein nur das Pre-S2 zusammen mit dem S-Antigen umfasst (281 Aminosäuren). Die Pre-S Proteine weisen unterschiedliche Glykosilierungsgrade auf und tragen die Rezeptoren für die Erkennung der Leberzellen. Sofern nicht anders angegeben, beziehen sich die Aminosäurepositionen in dieser Anmeldung auf das S-Antigen (226 aa) ohne Pre-S1- und ohne Pre-S2-Region.

Das C-Gen trägt die Information für das Nukleokapsid Protein, Hepatitis B Core Antigen (HBcAg). Die Translation dieses Proteins kann bereits in der Pre-C-region starten und zur Bildung von Hepatitis B e-Antigen (HBeAg) führen. Das HBeAg weist gegenüber HBcAg eine andere Faltung und Immunogenität auf. HBeAg kommt im Gegensatz zu HBcAg frei im Serum vor und wird bei positivem Nachweis als Indikator für die Bildung von HBcAg und damit für die Bildung infektiöser Viruspartikel angesehen.

Die im Viruspartikel enthaltene Reverse Transkriptions DNA-Polymerase wird von P-Gen codiert und für das Transaktivator X-Gen wird eine ursächliche Rolle bei der Entstehung von HBV-assoziierten primären Leberzell-Karzinomen diskutiert.

Der virale Replikationszyklus von HBV umfasst eine intrazelluläre pre-genomische RNA, die im viralen Nukleocapsid in die DNA umgeschrieben wird. Da die HBV - eigene Reverse Transkriptase DNA- Polymerase über keine Richtigkeits-Lesefähigkeit verfügt (proof-reading capability), werden mit relativ hoher Häufigkeit falsche Nukleotide eingebaut. Als Folge weist das HBV eine Mutationsrate auf, die mit ca. 1 Nukleotid/10000 Basen/Infektionsjahr etwa dem 10-fachen dessen entspricht, was andere DNA Viren aufweisen (Blum, Digestion 56: 85-95 (1995); Okamoto et al., Jpn. J. Exp. Med. 57: 231-236 (1987)).

Daneben treten auch recht häufig Deletionen und Insertionen auf (Carman et al., Lancet 341: 349-353 (1993)).

Die resultierende Variabilität von HBV drückt sich unter anderem in dem Auftreten von 9 serologisch definierten Subtypen (Courouce et al., Bibliotheca Haematologica 42: 1 (1976) und insgesamt mindestens 6 verschiedenen Genotypen aus, die mit A bis F bezeichnet werden (Abb. 1) und eine geographische Verteilung aufweisen. (Norder et al., J. Gen. Virol. 73: 3141-3145 (1992), Norder et al., Virology 198: 489-503 (1994)).

Außerdem werden eine Reihe von Mutanten beschrieben, bei denen 1 Aminosäure oder mehrere ausgetauscht vorliegen, fehlen oder überzählig sind.

Neben natürlicherweise stattfindenden Mutationen (Cooreman et al., Hepatology 30: 1287-1292 (1999) kann eine Gabe von HBV Immunglobulinen und / oder eine antivirale Therapie (z.B. mit Lamivudine) einen sogenannten Selektionsdruck ausüben, was zum vermehrten Auftreten sogenannter "Escape-Mutanten" führen und die Auftretens-Wahrscheinlichkeit von HBV-Mutanten deutlich erhöhen kann (Terrault et al., Hepatology 28: 555-561 (1998); Tillmann et al., Hepatology 30: 244-256 (1999); Hunt et al., Hepatology 31: 1037-1044 (2000).

Nicht alle HBV-Mutationen führen zu replikationsfähigen Viren und oft liegt eine Coexistenz von nicht vitalem und replikationsfähigem Virus vor, was auch die Sequenzierungs-Genauigkeit von isolierter DNA limitiert oder gar zur Nichterkennung von veränderten Sequenzen durch PCR, Klonierungsarbeiten mit anschließender Sequenzierung führt, wenn diese quantitativ < 10 % der Gesamt-DNA ausmachen (Cooreman et al., J. Biomed. Sci. 8: 237-247 (2001).

Demnach ist die Isolierung von Mutanten vorteilhaft, wobei die sich anschließende Identifizierung und Charakterisierung einzelner Mutanten möglicherweise zu verbesserten Vakzinen und Diagnostika führt.

Die Immunantwort nach einer Infektion mit HBV ist hauptsächlich gegen die sogenannte a-Determinante als eine allen Hepatitis B Viren gemeinsame Region des S-Proteins gerichtet, die sich auf der Oberfläche der Viruspartikel befindet (Gerlich et al., supra) und die den heterogensten Teil der B-Zell-Epitope des S-Gens darstellen.

Als Bindestellen für Antikörper werden nach heutigem Kenntnisstand insgesamt mindestens 5 sich teilweise überlappende Epitope auf der a-Determinante zwischen Aminosäure-Position 101 und 180 angenommen (Abb. 1 und 2) wie durch die Anwendung von monoklonalen Antikörpern gezeigt werden konnte (Peterson et al., J. Immunol. 132: 920-927 (1984)).

Es handelt sich hauptsächlich um komplexe Konformations-Epitope, die durch mehrere Disulfid-Brücken stabilisiert werden. Teilweise liegen auch Sequenz-Epitope vor, die mit Hilfe synthetisch hergestellter zyklischer Peptid-Strukturen dargestellt werden können.

Sogenannte "schützende Antikörper", die nach einer natürlichen Infektion mit HBV im Serum zirkulieren, sind zu 99% gegen die sehr immunogene a-Determinante des HBV gerichtet (Jilg, Vaccine 16: 65-68 (1998)).

Auf diese Tatsache stützt sich die breite Anwendung der Immunisierung mit Vakzinen, die entweder aus Humanserum isoliert oder gentechnologisch hergestellt wurden und die Verabreichung von Hepatitis B Immunglobulinen, die humane HBV - spezifische Antikörper enthalten. Beide prophylaktischen Strategien beruhen auf dem neutralisierenden Effekt, die HBs-spezifische Antikörper nach Bindung an die "a-Loop-Epitope" entfalten (Carman et al., Hepatology 24: 489-493 (1996), Muller et al., J. Hepatol. 13: 90-96 (1991) und Samuel et al., N. Engl. J. Med. 329: 1842-1847 (1993)).

Ähnlich beruhen die heute weit verbreiteten Diagnostika auf der Bindung von a-Determinanten-spezifischen Antikörpern an Epitope der a-Determinante.

So wird bei der im Blutspendewesen weltweit angewendeten HBsAg-Bestimmung mit immunochemischen Bestimmungsmethoden im Serum von Spendern zirkulierendes HBV Oberflächenantigen mit Antikörpern gegen die a-Determinante (polyklonal oder monoklonalen Ursprungs) nachgewiesen und bei positivem Resultat die entsprechende

Blutspende verworfen, um iatrogene HBV Infektionen durch HBV-kontaminiertes Blut zu verhindern. Eine weitere Anwendung der HBsAg-Bestimmung liegt im Nachweis einer vorliegenden akuten HBV-Infektion.

Umgekehrt wird mit der Bestimmung von HBs-spezifischen Antikörpern im Blut von Probanden mit einem positiven Bestimmungsergebnis von HBsAg-spezifischen Antikörpern (Anti-HBs) nachgewiesen, dass entweder eine natürliche Infektion abgelaufen oder dass eine durchgeführte Vakzinierung erfolgreich verlaufen ist.

Schließlich beruht auch die Nukleinsäure-Testung z.B. mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion ("Polymerase Chain Reaction" = PCR) auf der Verwendung von Primern, die für die HBV Nukleotide spezifisch sind.

Auf Grund der zentralen Rolle, die die a-Determinante bei der aktiven Immunisierung (Vakzinierung mit HBV Antigen), der passiven Immunisierung (Schutz durch HBV –spezifische Immunglobuline), dem Nachweis von Impferfolg bzw. stattgefundenen HBV Infektion (beides mittels Bestimmung von HBsAg-spezifischen Antikörpern, Anti-HBs) und schließlich der Sicherheit im Blutspendewesen (HBsAg-Bestimmung und PCR), ist verständlich, dass in Fachkreisen das Auftreten von Mutanten und auch neuen Varianten mit großer Aufmerksamkeit verfolgt wird.

Als Konsequenz könnten in der a-Determinante des HBV veränderte aber replikationsfähige neue Mutanten und/oder Varianten sowohl das prophylaktische als auch das diagnostische Konzept unterlaufen (Brind et al., J. Hepatol. 26: 228-235 (1997), Fischer et al., Transplant Proc. 31: 492-493 (1999), Ghany et al., Hepatology 27: 213-222 (1998), Protzer-Knolle et al., Hepatology 27: 254-263 (1998), Carman et al., Gastroenterology 102: 711-719 (1992) und Coleman et al., WO 02/079217 A1, (2002)).

Die Abgrenzung von Varianten und Mutanten des HBV ist nicht scharf, wobei ein diesbezüglicher Vorschlag breite Anwendung findet (Carman, J. Viral Hepat. 4 (suppl.1): 11-20 (1997). Dem zu Folge sollte die Bezeichnung "Variante" für natürlicherweise vorkommende Subtypen angewendet werden, die ohne bekannte Interferenz durch Selektionsdruck (antivirale Therapie und / oder Immunglobulin-Gabe) auftreten und ein geographisches Verteilungsmuster aufweisen.

Die Charakterisierung und anschließende Klassifizierung der Subtypen erfolgt mit Hilfe monoklonaler Antikörper und basiert auf einem veränderten Reaktionsmuster auf Grund des Austausches von einer oder wenigen Aminosäure(n). Die Grundlage der Klassifizierung stellen die Aminosäurepositionen 122 oder 160 der verbreitetsten HBV Sequenz dar: aa 122 und aa 160 = Lysin, K.

Alle Serotypen enthalten die Gruppen-spezifische a-Determinante, während die aa 122 und zusätzlich 133 und 134 den d- bzw. r-Subtyp und aa 160 die Zugehörigkeit zum w- bzw. r-Subtyp bestimmen. Auf dieser Basis lassen sich HBV Subtypen grob in adr, adw, ayr oder ayw einteilen, die sich weiter in mindestens 9 Sub-Subtypen unterscheiden lassen: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adwr2, adw4, adr<sub>q</sub><sup>+</sup> und adr<sub>q</sub><sup>-</sup> (Swenson et al., J. Virol. Meth. 33: 27-28 (1991), Blitz et al. J. Clin. Microbiol. 36: 648-651, Ashton-Rickardt et al., J. Med. Virol. 29: 204-214 (1989)).

Da diese Klassifizierung eine serologische Reaktivität zur Grundlage macht, muß nicht jede Typisierung notwendigerweise eine Variabilität auf der Aminosäure-Ebene bedeuten, weshalb dem Genotyping auf der S-Gen-Ebene der Vorzug gegeben wird (Ohba et al., Virus Res. 39: 25-34 (1995)).

Subtypen treten aus noch nicht bekannten Gründen in bestimmten geographischen und ethnischen Mustern auf.

Die Bezeichnung Mutation sollte nach Carman Varianten vorbehalten bleiben, die ausschließlich unter Selektionsdruck wie Vakzinierung oder antivirale Therapie entstehen. Es sind bereits viele Mutationen beschrieben worden, von denen manche zu diagnostisch falschen Befunden führten (Carman et al., Lancet 345: 1406-1407) und von denen die nachstehend genannten aa-Austausche beispielhaft zitiert werden:



- 7 -

Consensus:	aa-Position	Mutante:
I	110	V
P	111	T
T	114	S
T	116	S
P	120	T / S
T	123	A / N
I/T	126	A / S
Q	129	H / R
K/M	133	L
T	143	M / L
D	144	H / A / E
G	145	R / A
A	157	R

sowie

Cystein Austausch in den aa-Positionen 107, 124, 137, 147 & 149.

(Coleman, supra; Okamoto et al., *Pediatr. Res.* 32: 264-268 (1992); Zhang et al., *Scand. J. Infect. Dis.* 28: 9-15 (1996); Zuckermann et al., *Lancet* 343: 737-738 (1994)).

Überraschend wurde in einer Humanprobe eines an Leberentzündung erkrankten ägyptischen Patienten (interne Nummer: 118234, Entnahme vom 02. Okt. 2002) ein atypisches Reaktionsmuster von Hepatitis-Markern gefunden.

Neben dem Krankheitsbild mit Erhöhung der für eine derartige Infektion typischen Leberwerte weisen auch nachgewiesene Hepatitis Core Antikörper der IgM-Klasse auf eine akute HBV-Infektion hin, ohne dass allerdings der HBsAg-Nachweis mit einem zugelassenen leistungsstarken HBsAg-ELISA gelang.

Eine durchgeführte PCR ergab überraschend ein positives Resultat und das Sequenzierungsergebnis führte völlig überraschend zu den in Abb. 3 und 4 dargestellten Nukleotid-Sequenzen und den in Abb. 5 und 6 abgebildeten Aminosäure-Sequenzen.

Aus diesen Sequenzen wird deutlich, dass es sich völlig überraschend nicht um eine Punktmutation, d.h. Austausch weniger Nukleotide und auch nicht um einen möglicherweise serologisch zu charakterisierenden Subtyp handelt, da insgesamt n=11 Aminosäuren in der Region von aa 96 bis 180 gegenüber dem Genotyp D substituiert vorliegen. Im Hinblick auf

die Häufigkeit der Aminosäure-Substitutionen ist völlig überraschend davon auszugehen, dass es sich um einen neuen Wildtyp handelt oder dass die Mutationen so ausgeprägt sind, dass die Konsequenz eher als neue Variante zu beschreiben ist, die im Folgenden als HDB 11-Variante bezeichnet wird.

Die Analyse der besten Übereinstimmung der Aminosäuresequenz der  $\alpha$ -Determinante mit bekannten Sequenzen verweist auf Genotyp D (Abb. 1), Subtyp ayw2 (Abb. 2) von dem sich die neue Variante überraschend allerdings noch in 11 aa-Positionen unterscheidet. Prominentestes Merkmal sind die 10 Substitutionen in der Region zwischen aa 103 und 136 gemäß Abb. 1, 5 und 6.

Selbst wenn man die Möglichkeit berücksichtigt, dass eine Koexistenz der neuen HDB 11-Variante mit einem bekannten Wildtyp vorliegt, bleibt als überraschendes Merkmal die charakteristische und neue Sequenz in der Aminosäure-Region aa 114 bis 120 bestehen, die mit 6 neuen Aminosäure-Sequenzen/-Substitutionen zu beschreiben ist (Abb. 1).

Die vorliegende Erfindung betrifft daher ein Oligo- oder Polypeptid umfassend eine Aminosäuresequenz, die wenigstens 78 % Identität zu SEQ ID NO:14 hat. Die in SEQ ID NO:14 gezeigte Aminosäuresequenz entspricht den Aminosäurepositionen 93 bis 140 des S-Antigens von Hepatitis B, welches insgesamt eine Länge von 226 Aminosäuren aufweist. Bevorzugte Ausführungsformen betreffen ein Oligo- oder Polypeptid umfassend eine Aminosäuresequenz, die wenigstens 79 %, wenigstens 80 %, wenigstens 81 %, wenigstens 82 %, wenigstens 83 %, wenigstens 84 %, wenigstens 85 %, wenigstens 86 %, wenigstens 87 %, wenigstens 88 %, wenigstens 89 %, wenigstens 90 %, wenigstens 91 %, wenigstens 92 %, wenigstens 93 %, wenigstens 94 %, wenigstens 95 %, wenigstens 96 %, wenigstens 97 %, wenigstens 98 % oder wenigstens 99 % Identität zu SEQ ID NO:14 hat.

Die Erfindung betrifft auch ein Oligo- oder Polypeptid umfassend eine Aminosäuresequenz, die wenigstens 93 %, wenigstens 94 %, wenigstens 95 %, wenigstens 96 %, wenigstens 97 %, wenigstens 98 % oder wenigstens 99 % Identität zu SEQ ID NO:12 hat. Die in SEQ ID NO:12 gezeigte Aminosäuresequenz entspricht den Aminosäurepositionen 43 bis 196 des S-Antigens des Hepatitis B-Virus, welches eine Länge von 226 Aminosäuren aufweist.

Die Bestimmung der Identität zwischen zwei Aminosäuresequenzen ist dem Fachmann an sich bekannt und kann mit üblichen Computerprogrammen durchgeführt werden. Vorzugsweise wird die Bestimmung der Identität mit dem Computerprogramm "Bestfit" der Genetics Computer Group (Madison, WI) durchgeführt. Die Parameter werden in den Standardeinstellungen (default) verwendet. Vorzugsweise wird die am Prioritätstag der vorliegenden Anmeldung aktuelle Programmversion verwendet. Ein hoher Prozentwert der Identität bedeutet eine hohe Entsprechung, Gleichheit oder Äquivalenz zweier Sequenzen.

Das erfindungsgemäße Oligo- oder Polypeptid kann auch eine Aminosäuresequenz umfassen, in der gegenüber SEQ ID NO:14 null bis 10 Aminosäuren substituiert, deletiert oder inseriert sind. In der Aminosäuresequenz können auch 0 bis 9, 0 bis 8, 0 bis 7, 0 bis 6, 0 bis 5, 0 bis 4, 0 bis 3, 0 bis 2 Aminosäuren oder 1 Aminosäure gegenüber SEQ ID NO:14 substituiert, deletiert oder inseriert sein. Substitutionen können auch die Aminosäurepositionen betreffen, die den Positionen 96, 103, 114 bis 118, 120, 127, 129 und 136 des S-Antigens von HBV entsprechen.

Das erfindungsgemäße Oligo- oder Polypeptid kann auch eine Aminosäuresequenz umfassen, in der gegenüber SEQ ID NO:12 null bis 10 Aminosäuren substituiert, deletiert oder inseriert sind. In der Aminosäuresequenz können auch 0 bis 9, 0 bis 8, 0 bis 7, 0 bis 6, 0 bis 5, 0 bis 4, 0 bis 3, 0 bis 2 Aminosäuren oder 1 Aminosäure gegenüber SEQ ID NO:12 substituiert, deletiert oder inseriert sein.

Das erfindungsgemäße Oligo- oder Polypeptid kann auch eine Aminosäuresequenz umfassen, in der gegenüber SEQ ID NO:16 null bis 9 Aminosäuren substituiert, deletiert oder inseriert sind. In der Aminosäuresequenz können auch 0 bis 8, 0 bis 7, 0 bis 6, 0 bis 5, 0 bis 4, 0 bis 3, 0 bis 2 Aminosäuren oder 1 Aminosäure gegenüber SEQ ID NO:16 substituiert, deletiert oder inseriert sein.

Das Oligo- oder Polypeptid der vorliegenden Erfindung kann auch eine Aminosäuresequenz umfassen, die eine Teilsequenz von SEQ ID NO:12 mit wenigstens 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren von SEQ ID NO:12 ist, wobei die Teilsequenz wenigstens eine der Positionen 54, 61, 72, 73, 74, 75, 76, 78, 85, 87 und 94 von SEQ ID NO:12 einschließt. Diese Aminosäurepositionen entsprechen den Positionen 96, 103, 114 bis 118, 120, 127, 129 und 136 des S-Antigens von HBV. Vorzugsweise umfasst die Teilsequenz wenigstens 6, bevorzugter wenigstens 7, am bevorzugtesten wenigstens 8 aufeinanderfolgende Aminosäuren der in SEQ ID NO:12 gezeigten Aminosäuresequenz. In weiteren

Ausführungsformen umfasst die Teilsequenz wenigstens 9, wenigstens 10, wenigstens 11, wenigstens 12, wenigstens 13, wenigstens 14, wenigstens 15, wenigstens 20, wenigstens 25, wenigstens 30, wenigstens 35, wenigstens 40, wenigstens 45, wenigstens 50, wenigstens 55, wenigstens 60, wenigstens 65, wenigstens 70, wenigstens 75, wenigstens 80, wenigstens 85, wenigstens 90, wenigstens 95 oder wenigstens 100 aufeinanderfolgende Aminosäuren der in SEQ ID NO:12 gezeigten Aminosäuresequenz.

Vorzugsweise schließt die Teilsequenz zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht, neun, zehn oder alle elf der Positionen 54, 61, 72, 73, 74, 75, 76, 78, 85, 87 und 94 von SEQ ID NO:12 ein.

Das erfindungsgemäße Polypeptid kann auch ein Fragment eines HBs-Antigens eines Hepatitis B-Virus umfassen, wobei das Fragment eine Länge von wenigstens 5 Aminosäuren hat, das HBs-Antigen an Position 96 Alanin, an Position 103 Isoleucin, an Position 114 Alanin, an Position 115 Isoleucin, an Position 116 Asparagin, an Position 117 Asparagin, an Position 118 Arginin, an Position 120 Glutamin, an Position 127 Threonin, an Position 129 Histidin und/oder an Position 136 Tyrosin aufweist, und das Fragment Alanin 96, Isoleucin 103, Alanin 114, Isoleucin 115, Asparagin 116, Asparagin 117, Arginin 118, Glutamin 120, Threonin 127, Histidin 129 und/oder Tyrosin 136 umfasst. Das Oligo- oder Polypeptid kann ein, zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht, neun, zehn oder elf dieser spezifischen Aminosäurereste einschließen.

Die Mindestlänge der erfindungsgemäßen Oligo- oder Polypeptide beträgt 5, vorzugsweise 6, bevorzugter 7, am bevorzugtesten 8 Aminosäuren. Die Gesamtlänge des Oligo- oder Polypeptids ist in der Regel 5 bis 1000 Aminosäuren, vorzugsweise 6 bis 500 Aminosäuren, bevorzugter 7 bis 300 Aminosäuren, am bevorzugtesten 8 bis 200 Aminosäuren. Die Oligo- oder Polypeptide können auch Fremdaminosäuren enthalten, die nicht vom Genom eines Hepatitis B-Virus kodiert werden. So können Aminosäuren enthalten sein, die die Kopplung an feste Phasen erleichtern oder die Kopplung an Markierungssubstanzen ermöglichen. Es können Aminosäuren enthalten sein, die aufgrund der Klonierung entstanden sind und bei der rekombinanten Expression mit exprimiert wurden. Schließlich kann das erfindungsgemäße Oligo- oder Polypeptid ein Fusionsprotein sein, das neben von HBV abgeleiteten Aminosäuren einen Fusionspartner enthält, z. B. eine "tag"-Sequenz, die die Reinigung erleichtert, oder ein Proteinanteil, der die Löslichkeit und/oder Ausbeute bei der rekombinanten Expression erhöht. Derartige Fusionspartner sind dem Fachmann an sich bekannt.

In einer anderen Ausführungsform enthalten die Oligo- oder Polypeptide keine Fremdaminosäuren, die nicht vom Genom eines HBV kodiert werden. Entsprechend bestehen diese Oligo- oder Polypeptide aus einer der oben und/oder in den Ansprüchen beschriebenen Aminosäuresequenzen.

Das erfindungsgemäße Oligo- oder Polypeptid ist vorzugsweise immunogen, d.h. es kann eine Antikörperantwort in einem Säugerorganismus induzieren. Üblicherweise enthält das Oligo- oder Polypeptid wenigstens eine antigene Determinante oder wenigstens ein Epitop. In einer besonderen Ausführungsform enthält das Oligo- oder Polypeptid ein Epitop, das in anderen HBV-Varianten, z. B. in Subtyp ayw2, nicht enthalten ist.

Vorzugsweise umfasst das Oligo- oder Polypeptid eine der Aminosäuresequenzen SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29 und SEQ ID NO:30.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein immunogenes Peptid oder eine Mischung immunogener Peptide, enthaltend eines oder mehrere der in dieser Anmeldung beschriebenen Oligo- oder Polypeptide. Das immunogene Peptid oder die immunogene Mischung kann das/die Oligo- oder Polypeptide alleine oder in Verbindung mit bekannten HBV-Immunogenen enthalten.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Nukleinsäuremoleküle, die vom Genom der neuen HBV-Variante HDB 11 oder Mutanten davon abgeleitet sind, insbesondere Nukleinsäuremoleküle, die von dem Gen abgeleitet sind, das HSbAg kodiert.

Die Erfindung betrifft daher beispielsweise ein Oligo- oder Polynukleotid, das eine Nukleotidsequenz, die wenigstens 91% Identität zu SEQ ID NO:3 hat, umfasst. Die Nukleotidsequenz SEQ ID NO:3 kodiert für die Aminosäuresequenz SEQ ID NO:14. Bevorzugte Ausführungsformen betreffen ein Oligo- oder Polynukleotid umfassend eine Nukleotidsequenz, die wenigstens 92 %, wenigstens 93 %, wenigstens 94 %, wenigstens 95 %, wenigstens 96 %, wenigstens 97 %, wenigstens 98 %, oder wenigstens 99 % Identität zu SEQ ID NO:3 hat.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Oligo- oder Polynukleotid umfassend eine Nukleotidsequenz, die wenigstens 95 %, wenigstens 96 %, wenigstens 97 %, wenigstens 98 % oder wenigstens 99 % zu SEQ ID NO:1 hat. Die Nukleotidsequenz SEQ ID NO:1 kodiert für die Aminosäuresequenz SEQ ID NO:12.

Identität ist hier definiert als Grad der Gleichheit zwischen zwei Strängen von zwei DNA Segmenten. Ausgedrückt wird die Identität als prozentualer Wert, indem die Anzahl identischer Basen zweier zu vergleichender Sequenzen geteilt durch die Länge der kürzeren Sequenz und mit 100 multipliziert wird (Smith et al., Adv. Appl. Mathem. 2: 482-489 (1981).

Die Bestimmung der Identität zwischen zwei Aminosäuresequenzen ist dem Fachmann an sich bekannt und kann mit üblichen Computerprogrammen durchgeführt werden. Vorzugsweise wird die Bestimmung der Identität mit dem Computerprogramm "Bestfit" der Genetics Computer Group (Madison, WI) durchgeführt. Die Parameter werden in den Standardeinstellungen (default) verwendet. Vorzugsweise wird die am Prioritätstag der vorliegenden Anmeldung aktuelle Programmversion verwendet. Ein hoher Prozentwert der Identität bedeutet eine hohe Entsprechung, Gleichheit oder Äquivalenz zweier Sequenzen.

Diese Bewertung ist auch auf Aminosäuresequenzen von Peptiden und Proteinen anwendbar (Dayhoff, Atlas of Protein Sequences and Structure, M.O Dayhoff ed. 5 Suppl. 3: 353-358, Nat. Biom. Res. Found., Washington D.C., USA, Gribskov, Nucl. Acids Res. 14 (6): 6745-66763 (1986).

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Oligo- oder Polynukleotid umfassend eine Nukleotidsequenz, in der im Vergleich zu SEQ ID NO:3 null bis 13 Nukleotide substituiert, deletiert oder hinzugefügt sind. In der Nukleotidsequenz können auch 0 bis 12, 0 bis 11, 0 bis 10, 0 bis 9, 0 bis 8, 0 bis 7, 0 bis 6, 0 bis 5, 0 bis 4, 0 bis 3, 0 bis 2 Nukleotide oder 1 Nukleotid gegenüber SEQ ID NO:3 substituiert, deletiert oder inseriert sein.

Das erfindungsgemäße Oligo- oder Polynukleotid kann auch eine Nukleotidsequenz umfassen, die eine Teilsequenz von SEQ ID NO:1 mit wenigstens 8 aufeinanderfolgenden Nukleotiden von SEQ ID NO:1 ist, wobei die Teilsequenz wenigstens eine der Positionen 161, 183, 213, 214, 218, 221, 224, 227, 233, 234, 239, 253, 261, 281, 294, 306, 312, 387, 405 und 408 von SEQ ID NO:1 einschließt. Vorzugsweise umfasst die Teilsequenz wenigstens 9, bevorzugter wenigstens 10, am bevorzugtesten wenigstens 12 aufeinanderfolgende Nukleotide der in SEQ ID NO:1 gezeigten Nukleotidsequenz. In

weiteren Ausführungsformen umfasst die Teilsequenz wenigstens 15, wenigstens 18, wenigstens 20, wenigstens 25, wenigstens 30, wenigstens 35, wenigstens 30, wenigstens 35, wenigstens 40, wenigstens 45, wenigstens 50, wenigstens 60, wenigstens 70, wenigstens 80, wenigstens 90, wenigstens 100, wenigstens 120, wenigstens 150, wenigstens 175, wenigstens 200, wenigstens 250 oder wenigstens 300 aufeinanderfolgende Nukleotide der in SEQ ID NO:1 gezeigten Nukleotidsequenz.

Vorzugsweise schließt die Teilsequenz zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht, neun, zehn, elf, zwölf, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 oder alle 20 der Positionen 161, 183, 213, 214, 218, 221, 224, 227, 233, 234, 239, 253, 261, 281, 294, 306, 312, 387, 405 und 408 von SEQ ID NO:1 ein.

In einer anderen Ausführungsform umfasst das Oligo- oder Polynukleotid eine Nukleotidsequenz, die unter stringenten Bedingungen, vorzugsweise spezifisch, mit einem zu der Sequenz SEQ ID NO:1 komplementären Polynukleotid hybridisiert. In wiederum anderen Ausführungsformen umfasst das Oligo- oder Polynukleotid eine Nukleotidsequenz, die unter stringenten Bedingungen, vorzugsweise spezifisch, mit einem zu der Sequenz SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 und/oder SEQ ID NO:11 komplementären Polynukleotid hybridisiert. Verfahren zur Bestimmung, ob eine gegebenes Oligo- oder Polynukleotid mit einem anderen Polynukleotid hybridisiert, sind dem Fachmann an sich bekannt. Ein spezielles Beispiel für "stringente Bedingungen" sind folgende Bedingungen: a) 16-stündige Inkubation bei 42 °C in einer Lösung enthaltend 50 % Formamid, 5xSSC (150 mM NaCl, 15 mM Trinatriumcitrat), 50 mM Natriumphosphat pH 7,6, 5xDenhardt's Lösung, 10 % Dextransulfat und 20 µg/ml denaturierte, gescherte Lachssperma-DNA; b) anschließend Waschen in 0,1xSSC bei ungefähr 65 °C. Hybridisierungs- und Waschbedingungen sind dem Fachmann an sich bekannt und beispielhaft in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989) angegeben. Eine Nukleotidsequenz hybridisiert spezifisch an ein gegebenes Polynukleotid, wenn sie nicht oder wesentlich schwächer an andere Nukleotidsequenzen hybridisiert. Im vorliegenden Fall kann das bedeuten, dass die Nukleotidsequenz nicht oder nur schwach an für HBsAg kodierende Polynukleotide aus herkömmlichen HBV-Varianten (z. B. Genotyp D, Subtyp ayw2) hybridisiert.

Die Erfindung betrifft auch ein Oligo- oder Polynukleotid umfassend eine Nukleotidsequenz, die für ein erfindungsgemäßes Oligo- oder Polypeptid kodiert, wie es in dieser Anmeldung

beschrieben ist. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Oligo- oder Polynukleotid umfassend eine zu den oben beschriebenen Nukleotidsequenzen komplementäre Nukleotidsequenz.

Die Mindestlänge der erfindungsgemäßen Oligo- oder Polynukleotide beträgt 6, vorzugsweise 8, bevorzugter 10, am bevorzugtesten 12 Nukleotide. Die Gesamtlänge des Oligo- oder Polynukleotids ist in der Regel 6 bis 3000 Nukleotide, vorzugsweise 6 bis 1500 Nukleotide, bevorzugter 8 bis 900 Nukleotide, am bevorzugtesten 8 bis 600 Nukleotide. Die Oligo- oder Polynukleotide können auch Nukleotide enthalten, die nicht vom Genom eines Hepatitis B-Virus herkommen. So können Nukleotide enthalten sein, die für bestimmte Aminosäuren kodieren, die gewünschte Funktionen erfüllen sollen, wie oben beschrieben. Es können Nukleotide enthalten sein, die aufgrund der Klonierung entstanden sind, z. B. um bestimmte Schnittstellen einzuführen. Schließlich kann das erfindungsgemäße Oligo- oder Polynukleotid für ein Fusionsprotein kodieren, das neben von HBV abgeleiteten Aminosäuren einen Fusionspartner enthält, z. B. eine "tag"-Sequenz, die die Reinigung erleichtert, oder ein Proteinanteil, der die Löslichkeit und/oder Ausbeute bei der rekombinanten Expression erhöht. Derartige Fusionspartner und die sie kodierende DNA sind dem Fachmann an sich bekannt.

Bevorzugte Oligo- oder Polynukleotide der vorliegenden Erfindung umfassen eine Nukleotidsequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:11.

Die erfindungsgemäßen Polynukleotide können auch markiert sein, beispielsweise durch eine Fluoreszenzmarkierung oder eine radioaktive Markierung. Derartige Polynukleotide können vorteilhaft in einer Hybridisierungsreaktion oder einer Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt werden.

Die Erfindung betrifft auch einen Vektor oder ein Plasmid enthaltend ein Oligo- oder Polynukleotid gemäß der Erfindung. Das Plasmid kann beispielsweise ein Klonierungsvektor sein, der dazu dient, die Nukleinsäure in Wirtszellen zu vermehren oder bestimmte Restriktionsschnittstellen zur Verfügung zu stellen. Expressionsvektoren sind Vektoren, die die Expression der klonierten Nukleinsäure in Wirtszellen erlauben. Wirtszellen können verschiedene prokaryontische oder eukaryontische Zellen sein. Prokaryontische Wirtszellen sind z. B. bakterielle Zellen wie *E. coli*-Zellen. Die erfindungsgemäßen Expressionsvektoren



können bestimmte Steuerelemente wie z.B. Promotoren oder Bindungsstellen für Repressionsfaktoren enthalten. In einer weiteren Ausführungsform enthalten die Expressionsvektoren einen Nukleinsäureabschnitt, der für einen Teil eines Fusionsproteins kodiert.

Die Erfindung betrifft ebenfalls eine Zelle, z. B. eine Wirtszelle, die ein erfindungsgemäßes Polynukleotid, Plasmid oder einen erfindungsgemäßen Vektor enthält. Die Wirtszellen können unter geeigneten Bedingungen kultiviert werden, so dass eine Transkription der enthaltenen Nukleinsäure und nachfolgende Translation stattfindet. Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids, bei dem man ein Polynukleotid, ein Plasmid oder einen Expressionsvektor der Erfindung in Wirtszellen einbringt und die Wirtszellen unter Bedingungen kultiviert, die zur Expression des Polypeptids führen. Gegebenenfalls kann anschließend das Polypeptid aus den Wirtszellen gewonnen werden. Vorzugsweise findet die Herstellung des Polypeptids in Bakterien, am bevorzugtesten in *E. coli*-Zellen statt. Geeignete Mittel und Bedingungen zur Kultivierung sind beispielsweise in Ausubel et al. (1993) "Current Protocols in Molecular Biology" beschrieben. Die Gewinnung des exprimierten Polypeptids geschieht nach für den Fachmann an sich bekannten Methoden. Verschiedene Verfahren zur Proteinreinigung sind beispielsweise beschrieben in Scopes R. (1994) "Protein Purification: Principles and Practice" (3rd edition) Springer Verlag.

Die Polypeptide und Peptide der vorliegenden Erfindung können jedoch auch chemisch durch bekannte Verfahren wie z.B. Festphasensynthese hergestellt werden. Ebenso können die erfindungsgemäßen Polynukleotide durch bekannte Verfahren der chemischen Synthese hergestellt werden. Durch chemische Synthese erhaltene Polynukleotidfragmente können dann auch enzymatisch durch Ligasen verknüpft werden. Die erfindungsgemäßen Oligo- oder Polynukleotide können auch durch "site-directed mutagenesis" aus bekannten Sequenzen hergestellt werden, indem an bestimmten Positionen Punktmutationen eingeführt werden. Derartige Verfahren sind dem Fachmann an sich bekannt.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Antikörper, der an ein erfindungsgemäßes Oligo- oder Polypeptid bindet. Solche Antikörper können auf bekannte Weise hergestellt werden, entweder mittels eines Oligo- oder Polypeptids der Erfindung, z. B. eines Peptids mit einer der Sequenzen SEQ ID NO:12 bis 30, oder eines Fragments davon (Harlow und Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory). Es kann sich um polyklonale oder monoklonale Antikörper handeln, monoklonale Antikörper sind aber bevorzugt. Vorzugsweise handelt es sich um spezifische Antikörper, die gegen das HBsAg

der neuen HBV-Variante gerichtet sind, die aber HBsAg aus anderen HBV-Varianten, z. B. Genotyp D Subtyp ayw2, nicht erkennen. Solche Antikörper können erhalten werden, indem aufgrund eines Sequenzvergleichs der Aminosäuresequenzen des neuen HBsAg und HBsAg aus bekannten Stämmen Peptide ermittelt werden, die spezifisch für das neue HBsAg sind, und diese Peptide zur Herstellung der Antikörper verwendet werden. Es ist auch möglich, eine Mischung polyklonaler Antikörper herzustellen und sie durch Inkubation mit bekanntem HBsAg zu depletieren. In einer anderen Ausführungsform erkennt der Antikörper nicht nur das neue HBsAg, sondern auch bekannte HBsAg-Varianten. Dadurch ist es möglich, gleichzeitig verschiedene Varianten von HBsAg zu detektieren.

Der Antikörper der Erfindung kann an ein Oligo- oder Polypeptid binden, das aus einer Aminosäuresequenz besteht, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29 und SEQ ID NO:30. Besonders bevorzugt bindet der Antikörper an ein Oligo- oder Polypeptid, das aus einer Aminosäuresequenz besteht, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29 und SEQ ID NO:30. In einer besonderen Ausführungsform bindet der Antikörper nicht an die  $\alpha$ -Determinanten der bekannten HBV-Genotypen A, B, C, D, E und F (siehe Abb. 1). In einer besonderen Ausführungsform bindet der Antikörper nicht an die  $\alpha$ -Determinante von HBV Genotyp D, Subtyp ayw2.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein anti-idiotypischer Antikörper, der eine Aminosäuresequenz eines erfindungsgemäßen Oligo- oder Polypeptids repräsentiert. Verfahren zur Herstellung antiidiotypischer Antikörper sind dem Fachmann an sich bekannt.

Die Erfindung betrifft auch einen Testkit zum Nachweis von Hepatitis B-Viren, enthaltend ein erfindungsgemäßes Oligo- oder Polypeptid, ein erfindungsgemäßes Oligo- oder Polynukleotid und/oder einen erfindungsgemäßen Antikörper.

Die Erfindung bezieht sich auch auf ein immunogenes Peptid oder eine Mischung immunogener Peptide, enthaltend ein oder mehrere erfindungsgemäßen Oligo- oder Polypeptide alleine oder in Verbindung mit bekannten HBV-Immunogenen.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis eines Hepatitis B-Antigens, dadurch gekennzeichnet, dass (a) eine Probe mit einem erfindungsgemäßen Antikörper unter Bedingungen inkubiert wird, die die Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes gestatten; und (b) ein Antigen-Antikörper-Komplex, der den Antikörper enthält, nachgewiesen wird.

Es können monoklonale oder polyklonale Antikörper (oder Mischungen bzw. Fragmente davon oder Mischungen von Fragmenten), die mit Epitopen der neuen HBV Variante reagieren, dazu verwendet werden, die a-Determinante der erfindungsgemäßen HBV Variante in Form der gesamten Polypeptidsequenz oder Teilen davon in Untersuchungsproben zu bestimmen: HBsAg der HDB 11-Variante.

Dem Fachmann ist eine Vielzahl von Bestimmungsmethoden geläufig, bei denen mit einem oder mehreren monoklonalen Antikörper(n) oder polyklonalen Antikörpern (oder Mischungen davon bzw. Fragmenten oder Mischungen von Fragmenten), die spezifisch für die a-Determinante der HBV Variante sind, Immunkomplexe gebildet oder deren Bildung gehemmt werden.

Eine spezielle Ausführung stellt der sogenannte Enzymimmunoassay dar, von dem ein mögliches Testprinzip im folgenden beispielhaft beschrieben wird, ohne jedoch die erfindungsgemäße Idee darauf zu beschränken:

Bei dem sehr weit verbreiteten sogenannten Sandwich-Prinzip werden auf einem geeigneten Träger (z.B. Mikropartikel oder Oberfläche von Vertiefungen einer Mikrotitrationsplatte) immobilisierte Antikörper oder Fragmente davon mit der Untersuchungsprobe inkubiert. An die Antikörper gebundenes HBsAg wird nach Entfernen überschüssiger Probe detektiert, indem eine weitere Inkubation erfolgt mit Anti-HBs-Antikörpern (monoklonal oder polyklonal oder Fragmente bzw. Mischungen dieser Fragmente), die mit einer Sonde versehen sind. Als Sonde wird häufig ein Enzym eingesetzt, dessen katalytische Umsetzung (nach Entfernen des überschüssigen Reagenzes) eines geeigneten Substrates zu einer Farbreaktion führt, die photometrisch gemessen wird und deren Intensität dem in der Probe vorhandenen HBsAg-Gehalt proportional ist.

Neben dieser speziellen Ausführungsform sind auch Methoden bekannt, die homogener Natur sind (d.h. keine bound/free Trennung erfordern), die ganz ohne Sonde auskommen

(z.B. Agglutinationsverfahren), mit bloßem Auge auswertbar sind (z.B. radiale Immundiffusion) oder sich anderer Sonden (z.B. radioaktive Isotope oder Chemilumineszenz) bzw. mehrerer Sonden bedienen (wie z.B. Das Biotin/Streptavidin-System).

All diese Ausführungsformen entsprechen dem Stand der Technik, so dass unter "Bestimmung von HBsAg der neuen HBV Variante" mit der vorliegenden Erfindung alle Verfahren verstanden werden, die sich zum Nachweis von Polypeptidsequenzen oder Antigenen der neuen HBV Variante eignen, ungeachtet ob alleine das HBsAg der neuen Variante bestimmt wird oder in Verbindung mit HBsAg von bekannten a-Determinanten und/oder bekannten Mutationen in der a-Region.

Ebenso ist es möglich, aus ökonomischen Gründen eine HBsAg-Bestimmung mit einer Nachweismethode gegen einen weiteren Analyten (z.B. HIV-Antigen oder die gleichzeitige Bestimmung von HBV Varianten-HBsAg und dagegen gerichtete spezifische Antikörper) in einem Testansatz (differenzierend oder nicht-differenzierend) zu kombinieren.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern, die gegen ein Hepatitis B-Antigen gerichtet sind, dadurch gekennzeichnet, dass (a) eine Probe mit einem erfindungsgemäßen Oligo- oder Polypeptid unter Bedingungen inkubiert wird, die die Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes gestatten; und (b) der Antikörper-Antigen-Komplex, der das Oligo- oder Polypeptid enthält, nachgewiesen wird.

Eine spezielle Ausführung stellt der sogenannte Enzymimmunoassay dar, von dem ein mögliches Testprinzip im folgenden beispielhaft beschrieben wird, ohne jedoch die erfindungsgemäße Idee darauf einzuschränken:

Bei dem sehr weit verbreiteten sogenannten Sandwich-Prinzip werden auf einem geeigneten Träger (z.B. Mikropartikel oder Oberfläche von Vertiefungen einer Mikrotitrationsplatte) immobilisierte Epitop-tragende Polypeptid- oder Protein-Sequenzen mit der Untersuchungsprobe inkubiert. An die Epitope gebundene Antikörper werden nach Entfernen überschüssiger Probe detektiert, indem eine weitere Inkubation erfolgt mit Epitop-tragenden Polypeptid- oder Protein-Sequenzen, die mit einer Sonde versehen sind. Als Sonde wird häufig ein Enzym eingesetzt, dessen katalytische Umsetzung (nach Entfernen des überschüssigen Reagenzes) eines geeigneten Substrates zu einer Farbreaktion führt, die

photometrisch gemessen wird und deren Intensität dem in der Probe vorhandenen Antikörpergehalt proportional ist.

Neben dieser speziellen Ausführungsform sind auch Methoden bekannt, die homogener Natur sind (d.h. keine bound/free Trennung erfordern), die ganz ohne Sonde auskommen (z.B. Agglutinationsverfahren), mit bloßem Auge auswertbar sind (z.B. radiale Immundiffusion) oder sich anderer Sonden (z.B. radioaktive Isotope oder Chemilumineszenz) bzw. mehrerer Sonden bedienen (wie z.B. Das Biotin/Streptavidin-System).

Ebenso können die Polypeptidstrukturen der HBV Variante durch anti-idiotypische Antikörper dargestellt werden oder durch Wahl eines geeigneten Testprinzips auch Variantenspezifische monoklonale oder polyklonale Antikörper zur Bestimmung von Anti-HBs-Antikörpern (z.B. in einem kompetitiven Testformat) herangezogen werden. Es ist ebenso bekannt, dass durch Wahl des Testprinzips auch eine Differenzierung der Immunglobulin-Klassen erfolgen kann (z.B. durch das "indirekte" Verfahren mit einem zweiten Klassenspezifischen Antikörper (z.B. IgG oder IgM spezifisch) mit Sonde oder mit Hilfe des sogenannten Anti- $\mu$ -Prinzips (IgM spezifisch). Natürlich müssen die Methoden und Materialien (inkl. Sonde und Polypeptidsequenzen) dem jeweiligen Ziel angepaßt werden.

All diese Ausführungsformen entsprechen dem Stand der Technik, so dass unter "Bestimmung von Antikörpern, die für die a-Determinante der neuen HDB 11-Variante spezifisch sind" mit der vorliegenden Erfindung alle Verfahren verstanden werden, die sich zum Nachweis von Immunglobulinen und/oder Immunglobulin-Klassen gegen die neue HBV Variante eignen, ungeachtet ob alleine der Antikörper gegen die neue Variante gesucht wird oder in Verbindung mit Antikörpern gegen bekannte a-Determinanten und / oder bekannte Mutationen in der a-Region.

In einem anderen Verfahren kann eine Hepatitis B-Nukleinsäure nachgewiesen werden. Dieses Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass (a) eine Probe mit einem erfindungsgemäßen Oligo- oder Polynukleotid unter Bedingungen inkubiert wird, die die selektive Hybridisierung des Oligo- oder Polynukleotids mit einer Hepatitis B-Nukleinsäure in der Probe gestatten; und (b) bestimmt wird, ob Polynukleotidduplexe gebildet wurden, die das Oligo- oder Polynukleotid umfassen.

Die Hepatitis B-Nukleinsäure kann auch dadurch nachgewiesen werden, dass (a) eine Probe mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Oligo- oder Polynukleotid unter Bedingungen inkubiert wird, die die selektive Hybridisierung des Oligo- oder Polynukleotids mit einer Hepatitis B-Nukleinsäure in der Probe gestatten; (b) eine Polymerasekettenreaktion durchgeführt wird; und (c) bestimmt wird, ob eine Nukleinsäure amplifiziert wurde.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Oligo- oder Polynukleotids als Primer und/oder als Sonde. Die vorliegenden Nukleotidsequenzen können benutzt werden, um Primer und/oder Gensonden herzustellen, weshalb auch Kits, enthaltend Primer und/oder Sonden zum Nachweis von HBV Varianten-spezifischer Nukleinsäure entweder alleine oder in Verbindung mit bekannten HBV Nukleotidsequenzen in Untersuchungsproben ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind.

Auf Basis der vorliegenden Nukleotidsequenzen können Primer entwickelt werden, die in der sog. "Polymerase Chain Reaction" (PCR) Verwendung finden. Die PCR stellt eine Methode dar, um eine gewünschte Nukleotidsequenz einer Nukleinsäure oder eines Nukleinsäuregemisches zu amplifizieren. Dabei werden die Primer jeweils spezifisch durch eine Polymerase mit der gewünschten Nukleinsäure als Leseraster verlängert. Nach Dissoziation von dem Originalstrang werden neue Primer hybridisiert und wiederum durch die Polymerase verlängert. Durch Wiederholung dieser Zyklen wird eine Anreicherung der gesuchten Zielsequenz-Moleküle erreicht.

In Bezug auf Nukleinsäuretests (NAT) ist es möglich, Nukleotid-Sequenzen der vorliegenden Erfindung zu verwenden, um DNA- Oligomere von 6-8 Nukleotiden oder größer herzustellen, die geeignet sind, als Hybridisierungssonden das virale Genom der hier beschriebenen HBV Variante in Personen nachzuweisen, die möglicherweise die Virus-Variante tragen, oder z.B. im Blutspendewesen Blutkonserven auf Vorhandensein des Varianten-Genoms entweder gezielt oder in Kombination mit dem Nachweis von Nukleotidsequenzen bekannter HBV Varianten und/oder HBV-Mutatanten zu screenen.

Ebenso können auf Basis der gefundenen Nukleotidsequenzen der neuen HBV Variante entsprechende Primer entwickelt werden, die für die neue Variante spezifisch sind oder sowohl die neue Variante als auch im Stand der Technik bekannte Varianten detektieren können.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein isoliertes Hepatitis B-Virus, das ein HBs-Antigen aufweist, das eine Aminosäuresequenz mit wenigstens 91 % Identität zu SEQ ID NO:12 umfasst. Vorzugsweise umfasst das HBs-Antigen des erfindungsgemäßen Virus die Aminosäuresequenz SEQ ID NO:12. Schließlich umfasst die Erfindung auch Kulturen von Gewebezellen, die mit der erfindungsgemäßen HBV-Variante infiziert sind ebenso wie die isolierte-HBV Variante selbst. Auch eine immunogene Zubereitung, die die attenuierte oder inaktivierte HDB 11 -Variante von HBV enthält, ist Gegenstand der Erfindung.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Oligo- oder Polynukleotids oder eines erfindungsgemäßen Oligo- oder Polypeptids zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung oder Vorbeugung einer HBV-Infektion. Insbesondere können die erfindungsgemäßen Oligo- oder Polynukleotide bzw. Oligo- oder Polypeptide zur Herstellung eines Impfstoffs gegen HBV verwendet werden.

Ferner schließt die Erfindung auch eine Vakzine ein umfassend ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung und ein gebräuchliches Adjuvans (z.B. Freund'sches adjuvans, Phosphat-gepufferte Saline o.ä.). Eine derartige Vakzine kann dazu verwendet werden, um die Bildung von Antikörpern in Säugetieren anzuregen. Ähnlich umfasst die Erfindung ein Partikel, das eine Nicht-Varianten spezifische Aminosäure-Sequenz beinhaltet, die eine Partikel-Bildung induziert zusammen mit einem Epitop-enthaltenden Polypeptid, das spezifisch für die erfindungsgemäße HBV Variante ist.

Die Nukleotidsequenzen der Erfindung können auch dazu verwendet werden, sog. Antisense Oligonukleotide darzustellen (gegebenenfalls für therapeutische Zwecke).

Weitere Aspekte der vorliegenden Erfindung sind die folgenden Gegenstände (1) bis (21):

- (1) Ein isoliertes Oligo- oder Polynukleotid mit einer der Sequenzen ausgewählt aus der Gruppe von SEQ ID NO:1 bis SEQ ID NO:11:

- 22 -

## SEQ ID NO:1

127 GGGGGAACCTACCGTGTGTCTTGGCCAAAATTGCGAGTCCCCAACCTCCAATCAC  
TCACCAACCTCCTGTCTCCAACCTTGCTGCTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTT  
ATCATCTTCCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTGTTGGCTCTTCTGGACTAT  
CAAGGTATATTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCTGCAATCAACAACAGGGGACAA  
TGCAAAACCTGCACGACTACTGCTCACGGAACCTCTATGTATCCCTACTGTTGCTGTACC  
AAACCTTCGGACGGAATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCCTGGGCTTTTCGAAAAA  
TTCCTATGGGAGTGGGCTCAGCCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTTCCCTTTGTT  
CAGTGGTTCTAGGGCTTTCCCCACTGTTTGGCTTTCAATTATATGG 588

## SEQ ID NO:2

277 TTCTTGTTGGCTCTTCTGGACTATCAAGGTATATTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCA  
GGATCTGCAATCAACAACAGGGGACAA 360

## SEQ ID NO:3

277 TTCTTGTTGGCTCTTCTGGACTATCAAGGTATATTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCA  
GGATCTGCAATCAACAACAGGGGACAAATGCAAAACCTGCACGACTACTGCTCACGGA  
ACC TCTATGTATCCCTACTGTTGCTGTACC 420

## SEQ ID NO:4

301 CAAGGTATATTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCTGCAATCAACAACAGG  
GGACAATGCAAA 366

## SEQ ID NO:5

301 CAAGGTATATTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCTGCAATCAACAACAGG  
GGACAATGCAAAACCTGCACGACTACTGCTCACGGAACCTCTATGTATCCCTACTGT  
TGCTGTACC 420

## SEQ ID NO:6

340 GCAATCAACAACAGG 354

## SEQ ID NO:7

340 GCAATCAACAACAGGGGACAA 360

## SEQ ID NO:8

340 GCAATCAACAACAGGGGACAATGCAAA 366

## SEQ ID NO:9

340 GCAATCAACAACAGGGGACAATGCAAAACCTGCACGACTACTGCTCAC 387

## SEQ ID NO:10

340 GCAATCAACAACAGGGGACAATGCAAAACCTGCACGACTACTGCTCACGGAACC  
TCTATGTATCCCTACTGTTGCTGTACC 420

## SEQ ID NO:11

361 TGCAAAACCTGCACGACTACTGCTCACGGAACCTCTATGTATCCCTACTGTTGC  
TGT ACC 420

- (2) Ein Oligo- oder Polynukleotid nach (1), das zu jeweils mindestens 65 % oder 66 % oder 67 % oder 68 % oder 69 % oder 70 % oder 71 % oder 72 % oder 73 % oder 74 % oder



75 % oder 76 % oder 77 % oder 78 % oder 79 % oder 80 % oder 81 % oder 82 % oder 83 % oder 84 % oder 85 % oder 86 % oder 87 % oder 88 % oder 89 % oder 90 % oder 91 % oder 92 % oder 93 % oder 94 % oder 95 % oder 96 % oder 97 % oder 98 % oder 99 % mit einer der Sequenzen ausgewählt aus der Gruppe von SEQ ID NO:1 bis SEQ ID NO:11 identisch ist.

- (3) Ein Oligo- oder Polynukleotid nach (1) oder (2), das mit einem Oligo- oder Polynukleotid, welches eine zu einer der Sequenzen, ausgewählt aus der Gruppe von SEQ ID NO:1 bis SEQ ID NO:11, komplementäre Sequenz hat, unter stringenten Bedingungen hybridisiert.
- (4) Ein isoliertes Oligo- oder Polynukleotid, welches für HBs-Antigen des Hepatitis B-Virus kodiert und ein Oligo- oder Polynukleotid nach (1), (2) oder (3) enthält.
- (5) Ein Fragment eines Oligo- oder Polynukleotids, welches für HBs-Antigen des Hepatitis B-Virus kodiert, dadurch gekennzeichnet, dass das Fragment ein Oligo- oder Polypeptid nach (1), (2) oder (3) enthält.
- (6) Ein isoliertes Oligo- oder Polynukleotid, welches für die a-Determinante des HBs-Antigens des Hepatitis B-Virus kodiert und ein Oligo- oder Polynukleotid nach (1), (2) oder (3) enthält.
- (7) Ein Primer, der für ein Oligo- oder Polynukleotid gemäß einem der Gegenstände (1) bis (6) spezifisch ist.
- (8) Ein Vektor, der mindestens ein Oligo- oder Polynukleotid gemäß einem der Gegenstände (1) bis (5) enthält.
- (9) Eine Wirtszelle, die einen Vektor nach (8) enthält.
- (10) Ein Oligo- oder Polypeptid welches durch ein Oligo- oder Polynukleotid nach einem der Gegenstände (1) bis (5) kodiert wird.
- (11) Isoliertes Oligo- oder Polypeptid, das eine Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe von SEQ ID NO:12 bis SEQ ID NO:30 hat:

- 24 -

## SEQ ID NO:12

43 G G T T V C L G Q N S Q S P T S N H  
S P T S C P P T C P G Y R W M C L R R F  
I I F L F I L L L C L I F L L A L L D Y  
Q G I L P V C P L I P G S A I N N R G Q  
C K T C T T T A H G T S M Y P Y C C C T  
K P S D G N C T C I P I P S S W A F G K  
F L W E W A S A R F S W L S L L V P F V  
Q W F V G L S P T V W L S V I W 196

## SEQ ID NO:13

93 F L L A L L D Y Q G I L P V C P L I P G  
S A I N N R G Q 120

## SEQ ID NO:14

93 F L L A L L D Y Q G I L P V C P L I P G  
S A I N N R G Q C K T C T T A H G T S  
M Y P Y C C C T 140

## SEQ ID NO:15

- 101 Q G I L P V C P L I P G S A I N N R G Q  
C K 122

## SEQ ID NO:16

101 Q G I L P V C P L I P G S A I N N R G Q  
C K T C T T T A H G T S M Y P Y C C C T 140

## SEQ ID NO:17

114 A I N N R 118

## SEQ ID NO:18

110 I P G S A 114

## SEQ ID NO:19

111 P G S A I 115

## SEQ ID NO:20

112 G S A I N 116

## SEQ ID No.: 21

113 S A I N N 117

## SEQ ID NO:22

115 I N N R G 119

## SEQ ID NO:23

116 N N R G Q 120

**SEQ ID NO:24**

117 N R G Q C 121

**SEQ ID NO:25**

118 R G Q C K 122

**SEQ ID NO:26**

114 A I N N R G Q 120

**SEQ ID NO:27**

114 A I N N R G Q C K 122

**SEQ ID NO:28**

114 A I N N R G Q C K T C T T T A H 129

**SEQ ID NO:29**114 A I N N R G Q C K T C T T T A H G T S M  
Y P Y C C C T 140**SEQ ID NO:30**

121 C K T C T T T A H G T S M Y P Y C C C T 140.

- (12) Oligo- oder Polypeptid gemäß (10) oder (11), das zu jeweils mindestens 65 % oder 66 % oder 67 % oder 68 % oder 69 % oder 70 % oder 71 % oder 72 % oder 73 % oder 74 % oder 75 % oder 76 % oder 77 % oder 78 % oder 79 % oder 80 % oder 81 % oder 82 % oder 83 % oder 84 % oder 85 % oder 86 % oder 87 % oder 88 % oder 89 % oder 90 % oder 91 % oder 92 % oder 93 % oder 94 % oder 95 % oder 99 % oder 97 % oder 98 % oder 99 % mit einer der Sequenzen, ausgewählt aus der Gruppe von SEQ ID NO:12 bis SEQ ID NO:30, identisch ist.
- (13) Isoliertes Polypeptid entsprechend der Sequenz des HBs-Antigens des Hepatitis B-Virus, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Oligo- oder Polypeptid gemäß einem der Gegenstände (10) bis (12) enthält.
- (14) Fragment eines Polypeptids, welches der Sequenz des HBs-Antigens des Hepatitis B-Virus entspricht, dadurch gekennzeichnet, dass das Fragment ein Oligo- oder Polypeptid gemäß einem der Gegenstände (10) bis (12) enthält.
- (15) Isoliertes Polypeptid, welches für die a-Determinante des HBs-Antigens des Hepatitis B-Virus kodiert, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Oligo- oder Polypeptid gemäß einem der Gegenstände (10) bis (12) enthält.

- (16) Monoklonaler oder polyklonaler Antikörper, der an HBs-Antigen, enthaltend ein Oligo- oder Polypeptid gemäß einem der Gegenstände (10) bis (15) bindet, der an HBs-Antigen eines Hepatitis B-Wildtypvirus aber nicht oder wenigstens signifikant schwächer bindet.
- (17) Ein anti-idiotypischer Antikörper, der eine Aminosäuresequenz gemäß einem der Gegenstände (10) bis (15) repräsentiert.
- (18) Testkit zum Nachweis oder zur Bestimmung mittels einer Hybridisierungsreaktion einer Nukleinsäure, die für eine Variante oder Mutante des Hepatitis B-Virus spezifisch ist, unter Verwendung mindestens eines Oligo- oder Polynukleotids gemäß einem oder mehreren der Gegenstände (1) bis (7).
- (19) Testkit zum immunchemischen Nachweis oder zur immunchemischen Bestimmung eines Antigens, das für eine Variante oder Mutante des Hepatitis B-Virus spezifisch ist, unter Verwendung mindestens eines monoklonalen oder polyklonalen Antikörpers gemäß (16).
- (20) Testkit zum immunchemischen Nachweis oder zur immunchemischen Bestimmung eines gegen eine Variante oder Mutante des Hepatitis B-Virus gerichteten Antikörpers unter Verwendung mindestens eines Oligo- oder Polypeptids gemäß einem der Gegenstände (10) bis (15).
- (21) Immunogenes Peptid oder Mischung immunogener Peptide enthaltend ein oder mehrere Oligo- oder Polypeptide gemäß einem oder mehreren der Gegenstände (3) und (4) alleine oder in Verbindung mit bekannten HBV-Immunogenen.

Die vorliegende Erfindung umfasst eine isolierte Nukleotid-Sequenz, die zu mindestens 65 % mit SEQ ID NO:1 identisch ist bzw. mit einem Fragment dieser in Abb. 3 und 4 dargestellten Sequenz, das spezifisch zum Komplement der SEQ ID NO:1 bis 11 hybridisiert.

Zusätzlich beinhaltet die vorliegende Erfindung eine isolierte Nukleotid-Sequenz, die die vorliegende erfindungsgemäße Variante der a-Determinante des Hepatitis B surface Antigens (HBsAg) in den Aminosäuren-Positionen zwischen aa 101 und 180 kodiert bzw. zu einem Peptid-Produkt führt, das in der aa-Sequenz zu mindestens 65 % mit der in Abb. 5

und 6 dargestellten SEQ ID NO:12 übereinstimmt oder Fragmenten davon gemäß SEQ ID NO:13 bis 30.

Des weiteren beinhaltet die vorliegende Erfindung einen Vektor, umfassend eine oder mehrere der genannten Nukleotid-Sequenzen wie auch eine Wirtszelle, die diesen Vektor enthält und eine Methode zur Darstellung eines entsprechenden Polypeptids aus der  $\alpha$ -Determinante, umfassend die Inkubation der oben genannten Wirtszelle über Zeiten und unter Bedingungen, die für die Expression des Polypeptides erforderlich sind.

Auch Gegenstand der Erfindung sind Antikörper, die mit der in SEQ ID NO:12 bis 30 beschriebenen  $\alpha$ -Determinante reagieren, wobei die Bindung bevorzugt in dem Aminosäurebereich aa 101 bis 150 erfolgt. Die Antikörper können polyklonalen oder monoklonalen tierischen oder menschlichen Ursprungs sein.

Eine isolierte HBV Variante ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung, wobei das Virus eine  $\alpha$ -Determinante aufweist, die den aa-Sequenzen mindestens zwischen Position 101 und 120 und/oder aa 121 bis 140 entspricht, idealerweise beiden genannten Regionen zwischen 101 und 140.

Auch eine immunogene Mischung zur Erzeugung polyklonaler oder monoklonaler Antikörper ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung umfassend das beschriebene isolierte HBV oder ein bzw. mehrere der beschriebenen Polypeptide.

Die Erfindung beinhaltet auch eine Polynukleotid-Sonde, enthaltend eine HBV Genom-Sequenz, welche durch Substitution von Aminosäuren zu einer modifizierten  $\alpha$ -Determinanten führt, die mit der beschriebenen aa-Sequenz der neuen HBV-Variante identisch ist oder zu mindestens 65 % entspricht.

Auch Kits zum Nachweis von Polynukleotiden der HBV-Variante mit Hilfe der genannten Sonde wie auch Kits zum Nachweis von HBsAg der Variante bzw. einzelnen Epitopen davon und Antikörper, die für die Variante oder Epitope davon spezifisch sind, sind ebenso Gegenstand der Erfindung, wie die Methoden des Nachweises von Polynukleotiden, Antigen und Antikörper, umfassend eine Inkubation zur Bildung entsprechender Komplexe und Nachweis dieser Komplexe durch geeignete dem Fachmann bekannte Verfahren.

Die Ausführungsformen dieser Kits und Nachweismethoden können zum spezifischen und alleinigen Nachweis von Nukleotiden und Antigen der HBV-Variante bzw. dagegen gerichteter Antikörper ausgelegt sein oder supplementär, d.h. den zusätzlichen Nachweis der erfindungsgemäßen Varianten-Analyten zu derzeitig bekannten HBV-Nukleotiden, -Antigenen bzw. -Antikörpern gestatten.

Analog kann eine immunogene Mischung von erfindungsgemäßen Polypeptidsequenzen auch in Verbindung mit bekannten Antigenen z.B. für die Verbesserung der Wirksamkeit einer Vakzine angewendet werden.

Die vorliegende Erfindung beschreibt eine neue Variante des Hepatitis B Virus (HBV), die eine völlig neue a-Determinante als Resultat von Aminosäure-Austauschen in den nachfolgenden aa-Positionen der S-HBsAg Sequenz aufweist. Für die Beschreibung der Aminosäuren wird der 1-Buchstaben-Code verwendet:

aa von HDB 11	aa-Position	aa von ayw2/Genotyp D
I	103	M
A	114	S
I	115	T
N	116	T
N	117	S
R	118	T
Q	120	P
T	127	P
H	129	Q
Y	136	S.

Außerdem liegt in Position aa 96 von HDB 11 Alanin (A) statt Valin (V) vor:

A	96	V
---	----	---

Diese aa-Substitutionen lassen sich auf entsprechende Nukleotid-Substitutionen der entsprechenden Codons zurückführen.

Die vorliegende Erfindung betrifft eine isolierte Nukleotid-Sequenz, die für die a-Determinante des Virus kodiert (Abb. 3 sowie SEQ ID No.: 1).

Die Erfindung umfasst auch Nukleotide mit mindestens 65 % Übereinstimmung, bevorzugt mindestens 75 % Übereinstimmung und besonders bevorzugt mit mindestens 90 % Übereinstimmung mit der Nukleotid-Sequenz der vorliegenden Erfindung bzw. Fragmenten davon sowie dazu komplementäre Sequenzen.

Die Erfindung umfasst auch Polypeptide, die von oben beschriebenen Nukleotid-Sequenzen kodiert werden, insbesondere solche Aminosäuresequenzen, die die a-Determinante des HBsAg bestimmen und Polypeptide, die mindestens eine Ähnlichkeit von 65 %, bevorzugt 75 % und noch bevorzugter 95 % zu diesen Sequenzen aufweisen.

Für die Beschreibung der vorliegenden Erfindung wird unter einem Nukleotid-Fragment eine konsekutive Folge von mindestens 8 oder 9, bevorzugt 9-15, besonders bevorzugt 15-21 und sogar ganz besonders bevorzugt 21-60 Nukleotide aus der Nukleotidsequenz der neuen HBV-Variante verstanden, wobei auch Mischungen derartiger Nukleotid-Fragmente umfasst sind.

Unter einem Polypeptid-Fragment wird eine Folge von mindestens 3, bevorzugt 3-5, besonders bevorzugt 5-7 und sogar ganz besonders bevorzugt 7-20 Aminosäuren aus der a-Determinante der neuen HBV-Variante verstanden, wobei auch Mischungen derartiger Polypeptid-Fragmente unter diese Erfindung fallen.

Unter die vorliegende Erfindung fällt auch eine isolierte Nukleotid-Sequenz, die hybridisierbar ist und zu Nukleotid-Sequenzen führt, die den Nukleotidsequenzen des HBsAg der neuen HBV Variante oder Teilen der a-Determinante der neuen HBV Variante entsprechen, komplementär dazu sind oder als Subtyp oder Mutation auf HDB 11 zurückzuführen sind.

Dem Fachmann ist bekannt, dass eine Nukleotidsequenz nach deren Isolierung nach Methoden gemäß Stand der Technik in prokaryontische (z.B. E. coli), eukaryontische Wirtszellen (z.B. Chinese Hamster Ovary Cell) oder Hefe (z.B. S. Cerevisiae) mit Hilfe eines Vektors oder Konstruktes eingebracht werden können (mit dem Fachmann bekannten Methoden wie z.B. Transfektion, Transformation oder Elektroporation: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed., Vol. 1-3, ed Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), wobei transiente oder permanente Kulturen angewendet werden können.

Demzufolge umfasst die vorliegende Erfindung isolierte Nukleotidsequenzen der  $\alpha$ -Determinante der neuen HBV Variante, Polypeptide, die durch diese Nukleotide kodiert werden, Vektoren, die Nukleotidsequenzen der  $\alpha$ -Determinante der neuen HBV Variante enthalten wie auch die Wirtszelle, in die ein Vektor gebracht wird. Neben der Darstellung von Polypeptiden mit Hilfe eines Expressions-Systems (rekombinant oder gentechnologisch) ist dem Fachmann bekannt, dass analoge Polypeptid-Strukturen auch vollsynthetisch oder direkt durch Reinigung aus der Virusvariante hergestellt werden können.

Es ist möglich, die Polypeptide oder Proteine der neuen HBV Variante zur Erzeugung von monoklonalen und/oder polyklonalen Antikörpern zu verwenden, die immunologisch an Bindestellen (Epitope) der  $\alpha$ -Determinante der neuen HBV Variante binden. Die Methoden zur Darstellung von Antikörpern sind dem Fachmann bekannt (z.B. Koehler et al., Nature 256-494 (1975), Mimms et al., Vi. 176: 604-619 (1990)).

Ferner ist es möglich, die  $\alpha$ -Determinante der erfindungsgemäßen HDB 11-Variante in Form der gesamten Polypeptidsequenz oder Teilen davon für die Bestimmung von gegen die HBV Variante gerichteten Antikörpern (Anti-HBs-Antikörpern) zu verwenden (siehe oben).

Dem Fachmann ist eine Vielzahl von Bestimmungsmethoden geläufig, bei denen mit Polypeptiden aus der  $\alpha$ -Determinante der HBV Variante und Antikörpern tierischen oder menschlichen Ursprungs Immunkomplexe gebildet oder deren Bildung gehemmt werden.

Schließlich ist es möglich, monoklonale oder polyklonale Antikörper (oder Mischungen bzw. Fragmente davon oder Mischungen von Fragmenten), die mit Epitopen der neuen HBV Variante reagieren, dazu zu verwenden, die  $\alpha$ -Determinante der erfindungsgemäßen HBV Variante in Form der gesamten Polypeptidsequenz oder Teilen davon in Untersuchungsproben zu bestimmen: HBsAg der HDB 11-Variante.

Dem Fachmann ist eine Vielzahl von Bestimmungsmethoden geläufig, bei denen mit einem oder mehreren monoklonalen Antikörper(n) oder polyklonalen Antikörpern (oder Mischungen davon bzw. Fragmenten oder Mischungen von Fragmenten), die spezifisch für die  $\alpha$ -Determinante der HBV Variante sind, Immunkomplexe gebildet oder deren Bildung gehemmt werden.



Ebenso können auf Basis der gefundenen Nukleotidsequenzen der neuen HBV-Variante entsprechende Primer entwickelt werden.

Schließlich sind auch diagnostische Reagenzien als Kits Gegenstand der Erfindung, die basierend auf den oben beschriebenen Verfahren einen Nachweis von HBV Varianten-spezifischem Antigen (HBsAg) oder dagegen gerichtete Antikörper (Anti-HBs), entweder als singuläre Bestimmungen oder miteinander oder mit anderen bekannten HBV-Antigen bzw. spezifisch damit reagierenden Antikörpern bzw. auch mit ganz anderen Analyten kombinierbar.

Die vorliegende Erfindung ist darüber hinaus in den Patentansprüchen beschrieben.

#### **Beschreibung der Abbildungen:**

**Abb. 1** stellt eine Übersicht der Aminosäure-Sequenzen der  $\alpha$ -Determinante von 6 beschriebenen Genotypen des HBV im Vergleich zu HDB 11 dar.

In **Abb. 2** sind die Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzen der  $\alpha$ -Determinante sowie unmittelbar benachbarter Regionen des Genotyps D, Subtyp ayw2 von HBV dargestellt.

**Abb. 3** zeigt die Nukleotid-Sequenz der  $\alpha$ -Determinante des HBV surface Antigens für Subtyp ayw2 des Genotyps D von HBV im Vergleich zur Nukleotid-Sequenz von HDB 11.

**Abb. 4** fasst die Translations-relevanten Abweichungen der Nukleotid-Sequenz von HDB 11 zusammen.

In **Abb. 5** wird die Nukleotid-Sequenz von HDB 11 in der Region der  $\alpha$ -Determinante sowie die entsprechende Aminosäure-Sequenz dargestellt. Die  $\alpha$ -Determinante befindet sich zwischen Aminosäure No. 101 und 180 des kleinen HBsAg (Small, S).

**Abb. 6** zeigt die entsprechende Polypeptid-Sequenz der  $\alpha$ -Determinante von HDB 11, die von der in Abb. 5 beschriebenen Nukleotid-Sequenz kodiert wird.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die vorliegende Erfindung näher, ohne dass die Erfindung auf die beschriebenen Beispiele beschränkt ist.

**Beispiel 1: HBsAg-Bestimmung mittels Enzymimmunoassay, EIA**

Zur Bestimmung des surface Antigens von HBV, HBsAg im Blut des ägyptischen Patienten wurde der Enzymimmunoassay Enzygnost® HBsAg 5.0 der Fa. Dade Behring GmbH, Marburg Deutschland angewendet.

Es handelt sich um einen in Europa zugelassenen und leistungsfähigen Test, der den Angaben der Packungsbeilage gemäß abgearbeitet wurde.

Das zu Grunde liegende Testprinzip ist ein sogenannter Sandwich Test im Mikrotiterplatten-Format:

100 µl der zu untersuchenden Probe werden in einem Einschritt-Verfahren mit 25 µl Konjugat 1 (monoklonale HBsAg spezifische Antikörper von der Maus, die kovalent mit Biotin markiert sind) und immobilisierten HBsAg-spezifischen polyklonalen Antikörpern vom Schaf in Kontakt gebracht. Nach 60-minütiger Inkubation bei 37°C und Entfernen überschüssiger Komponenten durch 4-maliges Waschen der Platten-Kavitäten werden 100 µl Konjugat 2 zugegeben, das aus Streptavidin besteht, an das das Sonden-Enzym Peroxidase kovalent gebunden ist.

Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C und Entfernen überschüssiger Komponenten durch 4-maliges Waschen der Platten-Kavitäten werden 75 µl Chromogen-Puffer/Substrat-Lösung zugegeben, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Die Entwicklung des blau gefärbten Tetramethylbenzidin-Farbstoffes wird durch Zugabe von 75 µl Stopplösung (Schwefelsäure) unterbrochen und der Farbstoff bei 450 nm photometrisch gemessen.

Die Intensität der Farbentwicklung, gemessen an der optischen Dichte (O.D.) ist dem Gehalt der Untersuchungsprobe an HBsAg direkt proportional, wobei ein O.D. Wert von kleiner als dem Grenzwert als HBsAg-negativ bewertet wird. Der Grenzwert ist definiert als der O.D.-Mittelwert der parallel getesteten Kontrolle, negativ (im Testkit enthalten), zu dem ein konstanter Betrag von 0,05 O.D. addiert wird.

Die Nachweisgrenzen des zur Untersuchung herangezogenen Lots (# 32874) wurden mit den international akzeptierten Standardpräparationen des Paul-Ehrlich-Institutes, Langen Deutschland zu 0,012 ng ad-Subtyp/ ml bzw. 0,015 ng ay-Subtyp / ml in parallelen

Versuchsansätzen aus Testungen von Verdünnungen der Standardpräparationen in HBsAg-negativem Serum durch graphische Interpolation ermittelt.

Die Untersuchung der Probe # 118234 (Entnahme vom 02. Okt. 2002, aus der auch die DNA-Isolierung vorgenommen wurde) brachte in 2 unabhängigen Versuchen an zwei verschiedenen Tagen Ergebnisse von 0,04 und 0,05 O.D., die den Kriterien des Testes entsprechend als HBsAg-negativ zu interpretieren sind. Die mitgeführte Kontrolle, positiv (im Testkit enthalten) war dagegen ebenso positiv (Validierungskriterien erfüllt) wie die erwähnten ad- und ay-Standardpräparationen.

#### **Beispiel 2: Isolierung der HDB 11- DNA aus Probe # 118234**

Aus einem 200 µl-Aliquot der ägyptischen Probe wurde die DNA isoliert, indem der QIA amp® DNA Blood Mini Kit der Fa. Qiagen, Hilden Deutschland) angewendet wurde. Dabei wurden alle Verfahrensschritte wie in der Packungsbeilage beschrieben befolgt und die Elution in einem Volumen von 50 µl vorgenommen.

#### **Beispiel 3: Polymerase Ketten Reaktion, PCR**

##### **3.1 HBV Primer**

Die vier nachstehenden HBV Primer wurden verwendet:

Primer 1 mit der 5'> 3'- Sequenz: GGGTCACCATATTCTTGGGAAC (SEQ ID NO:31)

Primer 2 mit der 5'> 3'- Sequenz: TATACCCAAAGACAAAAGAAAATTGG  
(SEQ ID NO:32)

Primer 3 mit der 5'> 3'- Sequenz: GACTCGTGGTGGACTTCTCTC (SEQ ID NO:33)

Primer 4 mit der 5'> 3'- Sequenz: TACAGACTTGGCCCCCAATACC (SEQ ID NO:34)

##### **3.2 PCR-Amplifikation**

Es wurde eine sogenannte nested PCR amplification des surface Antigens durchgeführt, wobei der Perkin Elmer Ampli Taq ® DNA Polymerase Kit sowie der Thermocycler Gene Amp ® PCR system 9700 der Fa. Perkin Elmer Applied Biosystems, USA verwendet wurde.

Die Nukleotide wurden von der Fa. Amersham Biosciences, UK bezogen.

Für den ersten Amplifikations-Zyklus wurden 5 µl der isolierten DNA unter Verwendung der oben genannten Primer 1 und 2 sowie folgenden Bedingungen amplifiziert:

**PCR 1 rxn**

Primer 1 (10 µM)	1 µl	
Primer 2 (10 µM)	1 µl	
10fach konz. Puffer (incl. 15 µM Mg <sub>2</sub> Cl)	5 µl	
dNTP Mischung (10 µM)	1 µl	
dest. Wasser	36,75 µl	
Ampli Taq (5 U/ µl)	<u>0,25 µl</u>	
Pro Röhrchen	45 µl	Gesamtvolumen
	plus <u>5 µl</u>	isolierte DNA
		50 µl Reaktionsvolumen

Der 50 µl-Ansatz wurde unter Verwendung des beschriebenen Thermocyclers unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

94° C, 1 min. / 94°C, 28 sek. – 50° C, 28 sek. – 72 ° C, 38 sek.  
(35 cycles) / 72 ° C, 5 min. / 8 °C soak.

In der zweiten Amplifizierungsrunde wurde 5 µl des ersten PCR Produktes weiter amplifiziert unter Verwendung der HBV Primer 3 und 4 und folgenden Bedingungen:

**PCR 2 rxn**

Primer 3 (10 µM)	1 µl	
Primer 4 (10 µM)	1 µl	
10 –fach konz. Puffer	5 µl	
dNTP Mischung (10 µM)	1 µl	
dest. Wasser	36,75 µl	
Ampli Taq (5 U/ µl)	<u>0,25 µl</u>	
Pro Röhrchen 45 µl	Gesamtvolumen	
plus	<u>5 µl</u>	PCR Produkt v.rxn
	50 µl	Reaktionsvolumen

Dieser PCR 2 -Ansatz wurde unter Verwendung des oben beschriebenen Thermocyclers amplifiziert, wobei folgende Bedingungen angewendet wurden:

94° C, 1 min. / 94° C, 28 sek. – 55° C, 28 sek. – 72 ° C, 38 sek.  
(35 cycles) / 72 ° C, 5 min. / 8 ° C soak.

Abschließend wurde das PCR 2 Produkt elektrophoretisch aufgetrennt (1,5 % Agarose) unter Mitführen geeigneter Molekulargewichtsmarker. Die Bande mit ca. 520 Basenpaaren wurde ausgeschnitten und mit Hilfe des QIA quick Gel Extraction Kit der Fa. Qiagen, Hilden Deutschland isoliert.

**Beispiel 4: Sequenzierung von HDB 11**

Das gereinigte PCR Produkt wurde von der Fa. Medigenomix, Martinsried, Deutschland mit Hilfe des ABI 3700 Kapillar Systems sequenziert in Verbindung mit der ABI BigDye Terminator Chemistry Version 1.1. und der ABI Sequencing Analysis Software Version 3.6. unter Verwendung der in Beispiel 3 beschriebenen Primer 3 und 4.

**Sequenzierungs-Ergebnis**

Es konnte gezeigt werden, dass das HBsAg der Probe innerhalb des sequenzierten Bereiches die beste Übereinstimmung der Nukleotid- und Aminosäure-Sequenz mit dem

Genotyp D, Subtyp ayw2 zeigt, aber in der Region der a-Determinante insgesamt 10 Aminosäure-Substitutionen aufweist (siehe auch Abb. 2 und 5):

**HDB 11:****D, ayw2:**

- |      |         |                   |
|------|---------|-------------------|
| 1.)  | Ile (I) | gegen 103 Met (M) |
| 2.)  | Ala (A) | gegen 114 Ser (S) |
| 3.)  | Ile (I) | gegen 115 Thr (T) |
| 4.)  | Asn (N) | gegen 116 Thr (T) |
| 5.)  | Asn (N) | gegen 117 Ser (S) |
| 6.)  | Arg (R) | gegen 118 Thr (T) |
| 7.)  | Gln (Q) | gegen 120 Pro (P) |
| 8.)  | Thr (T) | gegen 127 Pro (P) |
| 9.)  | His (H) | gegen 129 Gln (Q) |
| 10.) | Tyr (Y) | gegen 136 Ser (S) |

Zusätzlich liegt eine Aminosäure-Substitution in der Position # 96 vor:

- |      |         |                 |
|------|---------|-----------------|
| 11.) | Ala (A) | gegen 96Val (V) |
|------|---------|-----------------|

Diese Ergebnisse wurden in mehreren unabhängigen Versuchen aus verschiedenen Primär-Röhrchen der Blutentnahme vom 02. Okt. 2002 mit den gleichen Sequenzierungs-Ergebnissen reproduziert.

Als einzige Ausnahme wurde in der ersten Analyse die Position aa# 122 als Arg R gelesen, während die zweite Analyse eher für Lys (K) sprach.

Das Nukleotid-Profil läßt beide Interpretationen zu, was allerdings auch Hinweis für das Vorliegen der Koexistenz zweier Hepatitis B Viren mit unterschiedlicher Subtypisierung (ad bzw. ay) sprechen könnte, aber an der Aminosäure-Sequenz bzw. dem Rückschluß auf das Vorhandensein einer neuen Variante mit oben genannten Aminosäure-Substitutionen nichts ändert.

Dies wird unter anderem aus dem negativen EIA Ergebnis geschlossen, da nennens-werte Mengen zirkulierenden HBsAg bekannter Struktur im Hinblick auf die sehr guten Nachweisgrenzen der angewendeten EIA Bestimmungsmethode in jedem Fall Anlaß zu einem positiven EIA-Ergebnis hätte geben müssen.

Die Aminosäure, die Position 122 entspricht, kann daher in den Sequenzen SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29 und SEQ ID NO:30 entweder K oder R sein.

**Patentansprüche:**

1. Oligo- oder Polypeptid umfassend
  - (a) eine Aminosäuresequenz, die wenigstens 78 % Identität zu SEQ ID NO:14 hat;
  - (b) eine Aminosäuresequenz, in der gegenüber SEQ ID NO:14 null bis 10 Aminosäuren substituiert, deletiert oder inseriert sind;
  - (c) eine Aminosäuresequenz, die eine Teilsequenz von SEQ ID NO:12 mit wenigstens 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren von SEQ ID NO:12 ist, wobei die Teilsequenz wenigstens eine der Positionen 54, 61, 72, 73, 74, 75, 76, 78, 85, 87 und 94 von SEQ ID NO:12 einschließt; oder
  - (d) ein Fragment eines HBs-Antigens eines Hepatitis B-Virus, wobei das Fragment eine Länge von wenigstens 5 Aminosäuren hat, das HBs-Antigen an Position 96 Alanin, an Position 103 Isoleucin, an Position 114 Alanin, an Position 115 Isoleucin, an Position 116 Asparagin, an Position 117 Asparagin, an Position 118 Arginin, an Position 120 Glutamin, an Position 127 Threonin, an Position 129 Histidin und/oder an Position 136 Tyrosin aufweist, und das Fragment Alanin 96, Isoleucin 103, Alanin 114, Isoleucin 115, Asparagin 116, Asparagin 117, Arginin 118, Glutamin 120, Threonin 127, Histidin 129 und/oder Tyrosin 136 umfasst.
2. Oligo- oder Polypeptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es mit Seren aus Individuen reagiert, die mit der Hepatitis B-Variante HDB 11 infiziert sind.
3. Oligo- oder Polypeptid nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Aminosäuresequenz umfasst, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29 und SEQ ID NO:30.
4. Oligo- oder Polynukleotid umfassend
  - (a) eine Nukleotidsequenz, die wenigstens 91% Identität zu SEQ ID NO:3 hat,



- (b) eine Nukleotidsequenz, in der im Vergleich zu SEQ ID NO:3 null bis 13 Nukleotide substituiert, deletiert oder hinzugefügt sind,
- (c) eine Nukleotidsequenz, die eine Teilsequenz von SEQ ID NO:1 mit wenigstens 8 aufeinanderfolgenden Nukleotiden von SEQ ID NO:1 ist, wobei die Teilsequenz wenigstens eine der Positionen 161, 183, 213, 214, 218, 221, 224, 227, 233, 234, 239, 253, 261, 281, 294, 306, 312, 387, 405 und 408 von SEQ ID NO:1 einschließt;
- (d) eine Nukleotidsequenz, die unter stringenten Bedingungen spezifisch mit einem zu der Sequenz SEQ ID NO:1 komplementären Polynukleotid hybridisiert, oder
- (e) eine Nukleotidsequenz, die für ein Oligo- oder Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3 kodiert;

oder ein dazu komplementäres Oligo- oder Polynukleotid.

5. Oligo- oder Polynukleotid nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Nukleotidsequenz umfasst, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:11.

6. Oligo- oder Polynukleotid nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Länge von 10 bis 30 Nukleotiden hat.

7. Vektor oder Plasmid enthaltend ein Oligo- oder Polynukleotid nach einem der Ansprüche 4 bis 6.

8. Zelle, die mit einem Vektor oder Plasmid nach Anspruch 7 transformiert oder transfiziert wurde.

9. Zelle, die ein Oligo- oder Polynukleotid nach einem der Ansprüche 4 bis 6 oder einen Vektor oder ein Plasmid nach Anspruch 7 enthält.

10. Verfahren zur Herstellung eines Oligo- oder Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 3, das umfasst, dass man eine Zelle nach Anspruch 8 oder 9 unter geeigneten Bedingungen kultiviert, so dass das Oligo- oder Polypeptid exprimiert wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Oligo- oder Polypeptid aus den Zellen gewonnen wird und von anderen Oligo- oder Polypeptiden abgetrennt wird.

12. Antikörper, der an ein Oligo- oder Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3 bindet.
13. Antikörper nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass er an HBs-Antigen enthaltend ein Oligo- oder Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3 bindet, aber nicht oder signifikant schwächer an HBs-Antigen eines Hepatitis B-Virus Genotyp D, Subtyp ayw2.
14. Anti-idiotypischer Antikörper, der eine Aminosäuresequenz repräsentiert, wie sie in einem der Ansprüche 1 bis 3 definiert ist.
15. Testkit zum Nachweis von Hepatitis B-Viren, enthaltend
  - (i) ein Oligo- oder Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3;
  - (ii) ein Oligo- oder Polynukleotid nach einem der Ansprüche 4 bis 6; und/oder
  - (iii) einen Antikörper nach einem der Ansprüche 12 bis 14.
16. Immunogenes Peptid oder Mischung immunogener Peptide, enthaltend ein oder mehrere Oligo- oder Polypeptide nach einem der Ansprüche 1 bis 3 alleine oder in Verbindung mit bekannten HBV-Immunogenen.
17. Verfahren zum Nachweis eines Hepatitis B-Antigens, dadurch gekennzeichnet, dass
  - (a) eine Probe mit einem Antikörper nach Anspruch 12 oder 13 unter Bedingungen inkubiert wird, die die Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes gestatten; und
  - (b) ein Antigen-Antikörper-Komplex, der den Antikörper enthält, nachgewiesen wird.
18. Verfahren zum Nachweis von Antikörpern, die gegen ein Hepatitis B-Antigen gerichtet sind, dadurch gekennzeichnet, dass
  - (a) eine Probe mit einem Oligo- oder Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3 unter Bedingungen inkubiert wird, die die Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes gestatten; und
  - (b) der Antikörper-Antigen-Komplex, der das Oligo- oder Polypeptid enthält, nachgewiesen wird.
19. Verfahren zum Nachweis einer Hepatitis B-Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, dass

- (a) eine Probe mit einem Oligo- oder Polynukleotid nach einem der Ansprüche 4 bis 6 unter Bedingungen inkubiert wird, die die selektive Hybridisierung des Oligo- oder Polynukleotids mit einer Hepatitis B-Nukleinsäure in der Probe gestatten; und
  - (b) bestimmt wird, ob Polynukleotidduplexe gebildet wurden, die das Oligo- oder Polynukleotid umfassen.
20. Verfahren zum Nachweis einer Hepatitis B-Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, dass
- (a) eine Probe mit wenigstens einem Oligo- oder Polynukleotid nach einem der Ansprüche 4 bis 6 unter Bedingungen inkubiert wird, die die selektive Hybridisierung des Oligo- oder Polynukleotids mit einer Hepatitis B-Nukleinsäure in der Probe gestatten;
  - (b) eine Polymerasekettenreaktion durchgeführt wird; und
  - (c) bestimmt wird, ob eine Nukleinsäure amplifiziert wurde.
21. Verwendung eines Oligo- oder Polynukleotids nach einem der Ansprüche 4 bis 6 als Primer.
22. Verwendung eines Oligo- oder Polynukleotids nach einem der Ansprüche 4 bis 6 als Sonde.
23. Isoliertes Hepatitis B-Virus, das ein HBs-Antigen aufweist, das eine Aminosäuresequenz mit wenigstens 93 % Identität zu SEQ ID NO:12 umfasst.

**Abb. 1:** Aminosäuresequenz der HBsAg a-Determinante der verschiedenen HBV Genotypen im Vergleich zur neuen Variante HDB 11  
Für jeden Genotyp wurde ein repräsentatives Genom zu Grunde gelegt und die aa-Sequenz aus der Nukleotidsequenz abgeleitet  
A: X70 185; B: DOO331; C: XO1587; D: X72702, E: X75664; F: X75663; G: FR1 (Stuyver et al.; J. Gen. Virol. 81: 67-74 (2000); Norder et al.; J. Gen. Virol. 73: 3141-3145 (1992))

aa #	101	111	121	131	141	151	161	170
Genotyp								
A	QGMLPVCPLI	PGSTTTSTGP	CKTCTTPAQG	NSMFPSCCCT	KPTDGNCTCI	PIPSSWAF	AK	YLWEWASVRF
B	-----	---S---	-----	T-----	-----	-----	-----	-----
C	-----	L--TS---	-----	I-----	-----	-----	---R-	F--G-----
D	-----	---S---	---R---	T--Y---	-----	-----	---G-	F-----A--
E	-----	---S---	---R---	M-L---	T-----	-----	---G-	F-----A--
F	-----	-----	-----	L---	T-----	-----	---LG-	-----A--
HDB 11	--I-----	---AINNR-Q	-K- ---T-H-	T--Y-Y---	---S-----	-----	G- F	-----A--
			(R)					
aa #	103	114	120	129	136	143	159	168

Fett hervorgehoben sind die Aminosäure-Substitutionen, die von dem Wildtyp HBV Genotyp D, ayw2 abweichen

**Abb. 2 Nukleotid-Sequenz des S-Genes des bekannten Wildtyps HBV ayw2**  
das HBV Oberflächenprotein kodierend (surface antigen, HBsAg) und resultierende Aminosäure-Sequenz im 3-Buchstaben- bzw 1-Buchstaben-Code (Coleman et al; WO 02/079217 A1)

Fortlaufende Nummerierung Nukleotide (nt) das surface Antigen kodierend (excl. Pre S1- und Pre S2-Region)		Fortlaufende Nummerierung Aminosäuren (aa)	
1	60	20	60
1			
61	120	40	120
21			
121	180	60	180
41			
181	240	80	240
61			
241	300	100	300
81			
301	360	120	360
101			
361	420	140	420
121			
421	480	160	480
141			
481	540	180	540
161			
541	600	200	600
181			
601	660	220	660
201			
661			
221			

  

ATG GAG AAC ATC ACA TCA GGA TTC CTA GGA CCC CTG CTC GTG TTA CAG GCG GGG TTT TTC			
Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe			
M E N I T S G F L G P L L V L Q A G F F			
TTG TTG ACA AGA ATC CTC ACA ATA CCG CAG AGT CTA GAC TCG TGG TGG ACT TCT CTC AAT			
Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn			
L L T R I L T I P Q S L D S W W T S L N			
TTT CTA GGG GGA ACT ACC GTG TGT CTT GGC CAA AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT CAC			
Phe Leu Gly Thr Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His			
F L G G T T V C L G Q N S Q S P T S N H			
TCA CCA ACC TCC TGT CCT CCA ACT TGT CCT GGT TAT CGC TGG ATG TGT CTG CGG CGT TTT			
Ser Pro Thr Ser Cys Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe			
S P T S C P P T C P G Y R W M C L R R F			
ATC ATC TTC CTC TTC ATC CTG CTG CTA TGC CTC ATC TTC TTG GTT CTT CTG GAC TAT			
Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Val Leu Asp Tyr			
I I F L F I L L L C L I F L L V L L D Y			
CAA GGT ATG TTG CCC GTT TGT CCT CTA ATT CCA GGA TCA ACC ACC AGC ACG GGA CCC			
Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro			
Q G M L P V C P L I P G S S T T S T G P			
TGC AGA ACC TGC AGC ACT CCT GCT CAA GGA ACC TCT ATG TAT CCC TCC TGT TGC TGT ACA			
Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Tyr Pro Ser Cys Cys Thr			
C R T C T T P A Q G T S M Y P S C C T			
AAA CCT TCG GAT GGA AAC TGC ACC TGT ATT CCC ATC CCA TCA TCC TGG GCT TTC GGA AAA			
Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys			
K P S D G N C T C I P I P S S W A F G K			
TTC CTA TGG GAG TGG GCC TCA GCC CGT TTC TCT TGG CTC AGT TTA CTA GTG CCA TTT GTT			
Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Val Pro Phe Val			
F L W E W A S A R F S W L S L L V P F V			
CAG TGG TTC GTA GGG CTT TCC CCC ACT GTT TGG CTT TCA GTT ATA TGG ATG ATG TGG TAT			
Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Trp Tyr			
Q W F V G L S P T V W L S V I W M W Y			
TGG GGG CCA AGT CTG TAC TCC ATC TTG AGT CCC TTT TTA CCG CTG TTA CCA ATT TTC TTT			
Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe			
W G P S L Y S I L S P F L P L L P I F F			
TGT CTT TGG GTA TAC ATT	678		
Cys Leu Trp Val Tyr Ile	226		
C L W V Y I			

## Abb. 3

Nukleotid-Sequenz des HBV surface Antigen kodierenden S-Gens von dem Wildtyp HBV ayw2 (obere Reihe von nt 1 bis nt 678) im Vergleich zu der ab nt 127 bis nt 588 sequenzierten Nukleotid-Sequenz der neuen Variante HDB 11 (untere Reihe, in der Nukleotidabweichungen fett hervorgehoben und in Klammern gesetzt sind, die Mutation zu keinem Aminosäure-austausch führt)

1	ATG GAG AAC ATC ACA TCA GGA TTC CTA GGA CCC CTG CTC GTG TTA CAG GCG GGG TTT TTC	60
61	TTG TTG ACA AGA ATC CTC ACA ATA CCG CAG AGT CTA GAC TCG TGG TGG ACT TCT CTC AAT	120
121	TTT CTA GGG GGA ACT ACC GTG TGT CTT GGC CAA AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT CAC	180
181	- 127: GGG GGA ACT ACC GTG TGT CTT GGC CAA AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT CAC	240
241	TCA CCA ACC TCC TGT CCT CCA ACT TGT CCT GGT TAT CGC TGG ATG TGT CTG CGG CGT TTT	300
301	TCA CCA ACC TCC TGT CCT CCA ACT TGT CCT GGT TAT CGC TGG ATG TGT CTG CGG CGT TTT	360
361	ATC ATC TTC CTC TTC ATC CTG CTG CTA TGC CTC ATC TTC TTG TTG GTT CTT CTG GAC TAT	420
421	ATC ATC TTC CTC TTC ATC CTG CTG CTA TGC CTC ATC TTC TTG TTG GCT CTT CTG GAC TAT	480
481	CAA GGT ATG TTG CCC GTT TGT CCT CTA ATT CCA GGA TCA TCA ACC ACC AGC ACG GGA CCC	540
541	CAA GGT ATA TTG CCC GTT TGT CCT CTA ATT CCA GGA(TCT)GCA ATC AAC AAC AGG GGACAA	600
601	TGC AAA ACC TGC ACG ACT CCT GCT CAA GGA ACC TCT ATG TAT CCC TCC TGT TGC TGT ACA	660
661	TGC AAA ACC TGC ACG ACT ACT GCT CAC GGA ACC TCT ATG TAT CCC TAC TGT TGC TGT (ACC)	
	AAA CCT TCG GAT GGA AAC TGC ACC TGT ATT CCC ATC CCA TCA TCC TGG GCT TTC GGA AAA	
	AAA CCT TCG(GAC)GGA(AAT)TGC ACC TGT ATT CCC ATC CCA TCA TCC TGG GCT TTC GGA AAA	
	TTC CTA TGG GAG TGG GCC TCA GCC CGT TTC TCT TGG CTC AGT TTA CTA GTG CCA TTT GTT	
	TTC CTA TGG GAG TGG GCC TCA GCC CGT TTC(TCC)TGG CTC AGT TTA CTA GTT(CCC)TTT GTT	
	CAG TGG TTC GTA GGG CTT TCC CCC ACT GTT TGG CTT TCA GTT ATA TGG ATG ATG TGG TAT	
	CAG TGG TTC GTA GGG CTT TCC CCC ACT GTT TGG CTT TCA GTT ATA TGG 588	
	TGG GGG CCA AGT CTG TAC TCC ATC TTG AGT CCC TTT TTA CCG CTG TTA CCA ATT TTC TTT	
	TGT CTT TGG GTA TAC ATT 678	

**Abb. 4** Nukleotidsequenz des S-Gens der neuen HBV Variante HDB 11:  
nt 127 bis nt 588 des HBV surface Antigen kodierenden Genoms.  
Fett markiert sind nur die Nukleotid-Abweichungen, die zu einer  
veränderten Aminosäure-Sequenz führen.

```

- 127:  GGG GGA ACT ACC GTG TGT CTT GGC CAA AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT CAC 180
181  TCA CCA ACC TCC TGT CCT CCA ACT TGT CCT GGT TAT CGC TGG ATG TGT CTG CGG CGT TTT 240
241  ATC ATC TTC CTC TTC ATC CTG CTG CTA TGC CTC ATC TTC TTG TTG GCT CTT CTG GAC TAT 300
301  CAA GGT ATA TTG CCC GTT TGT CCT CTA ATT CCA GGA TCT GCA ATC AAC AAC AGG GGACAA 360
361  TGC AAA ACC TGC ACG ACT ACT GCT CAC GGA ACC TCT ATG TAT CCC TAC TGT TGT ACC 420
      (AGA, 364-366)
421  AAA CCT TCG GAC GGA AAT TGC ACC TGT ATT CCC ATC CCA TCA TCC TGG GCT TTC GGA AAA 480
481  TTC CTA TGG GAG TGG GCC TCA GCC CGT TTC TCC TGG CTC AGT TTA CTA GTT CCC TTT GTT 540
541  CAG TGG TTC GTA GGG CTT TCC CCC ACT GTT TGG CTT TCA GTT ATA TGG 588

```

Abb. 5 S-Gen Nukleotid-Sequenz (nt 127 bis 588) und entsprechende Aminosäure-Sequenz (aa 43 bis 196) der neuen HBV Variante HDB 11 (fett und unterstrichen hervorgehoben sind Aminosäuren, die im Vergleich zum Wildtyp HBV ayw2 substituiert vorliegen)

181	- 127:	GGG GGA ACT ACC GTG TGT CTT GGC CAA AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT CAC	180
	- aa 43:	G G T T V C L G Q N S Q S P T S N H	60
241	61	TCA CCA ACC TCC TGT CCT CCA ACT TGT CCT GGT TAT CGC TGG ATG TGT CTG CGG CGT TTT	240
		S P T S C P P T C P G Y R W M C L R F	80
301	81	ATC ATC TTC CTC TTC ATC CTG CTG CTA TGC CTC ATC TTC TTG TTG GCT CTT CTG GAC TAT	300
		I I F L F I L L L C L I F L L A L L D Y	100
361	101	CAA GGT ATA TTG CCC GTT TGT CCT CTA ATT CCA GGATCT GCA ATC AAC AAC AGG GGACAA	360
		Q G I L P V C P L I P G S A I N N R G Q	120
421	121	TGC AAA ACC TGC ACG ACT ACT GCT CAC GGA ACC TCT ATG TAT CCC TAC TGT TGT TGT ACC	420
		C K T C T T A H G T S M Y P Y C C C T	140
		(AGA)	
		(R in a 122)	
481	141	AAA CCT TCG GAC GGA AAT TGC ACC TGT ATT CCC ATC CCA TCA TCC TGG GCT TTC GGA AAA	480
		K P S D G N C T C I P I P S S W A F G K	160
541	161	TTC CTA TGG GAG TGG GCC TCA GCC CGT TTC TCC TGG CTC AGT TTA CTA GTT CCC TTT GTT	540
		F L W E W A S A R F S W L S L L V P F V	180
	181	CAG TGG TTC GTA GGG CTT TCC CCC ACT GTT TGG CTT TCA GTT ATA TGG	588
		Q W F V G L S P T V W L S V I W	-196

Die folgenden aa sind gegenüber dem Wildtyp HBV ayw2 bei der HDB 11-Variante substituiert (x):  
V 96 (A) (nicht in der Region der a-Determinante),  
M 103 (D), S 114 (A), T 115 (D), T 116 (N), S 117 (N), T 118 (R), P 120 (Q), P 127 (T), Q 129 (H) und  
S 136 (Y) (alle in der Region der a-Determinante).



Abb.6 Vergleich der Aminosäure-Sequenzen der a-Determinante (aa 100 bis aa 180) der neuen Variante HDB 11 (untere Reihe) mit dem Wildtyp HBV ayw2 (obere Reihe)

	aa-Sequenz Wildtyp ayw2:																		100
	aa-Sequenz Variante HDB 11:																		Y
101	Q	G	M	L	P	V	C	P	L	I	P	G	S	S	A	I	N	N	Y
	Q	G	I	L	P	V	C	P	L	I	P	G	S	S	A	I	N	N	Y
121	C	R	T	C	T	T	P	A	Q	G	T	S	M	Y	P	S	C	C	120
	C	K(R)	T	C	T	T	T	A	H	G	T	S	M	Y	P	Y	C	C	
141	K	P	S	D	G	N	C	T	C	I	P	I	P	S	S	W	A	F	140
	K	P	S	D	G	N	C	T	C	I	P	I	P	S	S	W	A	F	
161	F	L	W	E	W	A	S	A	R	F	S	W	L	S	L	L	V	P	160
	F	L	W	E	W	A	S	A	R	F	S	W	L	S	L	L	V	P	
																			180

6/6

Die folgenden aa sind gegenüber dem Wildtyp HBV ayw2 bei der HDB 11-Variante substituiert (x):  
V 96 (A) (nicht in der Region der a-Determinante),  
M 103 (I), S 114 (A), T 115 (I), T 116 (N), S 117 (N), T 118 (R), P 120 (Q), P 127 (T), Q 129 (H) und  
S 136 (Y) (alle in der Region der a-Determinante)

1/8

## SEQUENCE LISTING

<110> Dade Behring Marburg GmbH  
 <120> Neue Oberflaechenprotein-(HBsAg-) Variante des Hepatitis B Virus  
 <130> MA 1251  
 <150> DE 10328139.8  
 <151> 2003-06-20  
 <160> 34  
 <170> PatentIn version 3.2  
 <210> 1  
 <211> 462  
 <212> DNA  
 <213> Hepatitis B virus  
 <400> 1  
 gggggaacta cagtgtgtct tggccaaaat tcgcagtcac caacctcaa tcaactcacca 60  
 acctctgtc ctccaacttg tcttggttat cgctggatgt gtctgcggcg ttttatcatc 120  
 ttctcttca tctgtctgt atgcctcatc ttcttggttg ctcttctgga ctatcaaggt 180  
 atattgcccg tttgtctct aattccagga tctgcaatca acaacagggg acaatgcaaa 240  
 acctgcacga ctactgctca cggaacctct atgtatccct actgttgctg taccaaacct 300  
 tcggacggaa attgcacctg tattcccatc ccacatcctt gggctttcgg aaaattccta 360  
 tgggagtggg cctcagcccg tttctcttg ctcagtttac tagttccctt tgttcagtgg 420  
 ttcgtagggc tttccccac tgtttgctt tcagttatat gg 462  
 <210> 2  
 <211> 84  
 <212> DNA  
 <213> Hepatitis B virus  
 <400> 2  
 ttcttggttg ctcttctgga ctatcaaggt atattgcccg tttgtctct aattccagga 60  
 tctgcaatca acaacagggg acaa 84  
 <210> 3  
 <211> 144  
 <212> DNA  
 <213> Hepatitis B virus  
 <400> 3  
 ttcttggttg ctcttctgga ctatcaaggt atattgcccg tttgtctct aattccagga 60  
 tctgcaatca acaacagggg acaatgcaaa acctgcacga ctactgctca cggaacctct 120  
 atgtatccct actgttgctg tacc 144  
 <210> 4

2/8

<211> 66  
<212> DNA  
<213> Hepatitis B virus

<400> 4  
caaggtatat tgcccgtttg tcctctaatt ccaggatctg caatcaacaa caggggacaa 60  
tgcaaa 66

<210> 5  
<211> 120  
<212> DNA  
<213> Hepatitis B virus

<400> 5  
caaggtatat tgcccgtttg tcctctaatt ccaggatctg caatcaacaa caggggacaa 60  
tgcaaacct gcacgactac tgctcacgga acctctatgt atccctactg ttgctgtacc 120

<210> 6  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> Hepatitis B virus

<400> 6  
gcaatcaaca acagg 15

<210> 7  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Hepatitis B virus

<400> 7  
gcaatcaaca acaggggaca a 21

<210> 8  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Hepatitis B virus

<400> 8  
gcaatcaaca acaggggaca atgcaaa 27

<210> 9  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> Hepatitis B virus

<400> 9  
gcaatcaaca acaggggaca atgcaaaacc tgacgacta ctgctcac 48

<210> 10  
<211> 81  
<212> DNA  
<213> Hepatitis B virus

<400> 10

3/8

gcaatcaaca acaggggaga atgcaaaacc tgcacgacta ctgctcacgg aacctctatg 60  
 tatccctact gttgctgtac c 81

<210> 11  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> Hepatitis B virus

<400> 11  
 tgcaaaacct gcacgactac tgctcacgga acctctatgt atccctactg ttgctgtacc 60

<210> 12  
 <211> 154  
 <212> PRT  
 <213> Hepatitis B virus

<400> 12

Gly Gly Thr Thr Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser  
 1 5 10 15

Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg Trp  
 20 25 30

Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys  
 35 40 45

Leu Ile Phe Leu Leu Ala Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Ile Leu Pro Val  
 50 55 60

Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ala Ile Asn Asn Arg Gly Gln Cys Lys  
 65 70 75 80

Thr Cys Thr Thr Thr Ala His Gly Thr Ser Met Tyr Pro Tyr Cys Cys  
 85 90 95

Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser  
 100 105 110

Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe  
 115 120 125

Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu  
 130 135 140

Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp  
 145 150

<210> 13  
 <211> 28

4/8

<212> PRT  
 <213> Hepatitis B virus

<400> 13

Phe Leu Leu Ala Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Ile Leu Pro Val Cys Pro  
 1 5 10 15

Leu Ile Pro Gly Ser Ala Ile Asn Asn Arg Gly Gln  
 20 25

<210> 14  
 <211> 48  
 <212> PRT  
 <213> Hepatitis B virus

<400> 14

Phe Leu Leu Ala Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Ile Leu Pro Val Cys Pro  
 1 5 10 15

Leu Ile Pro Gly Ser Ala Ile Asn Asn Arg Gly Gln Cys Lys Thr Cys  
 20 25 30

Thr Thr Thr Ala His Gly Thr Ser Met Tyr Pro Tyr Cys Cys Cys Thr  
 35 40 45

<210> 15  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Hepatitis B virus

<400> 15

Gln Gly Ile Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ala Ile Asn  
 1 5 10 15

Asn Arg Gly Gln Cys Lys  
 20

<210> 16  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Hepatitis B virus

<400> 16

Gln Gly Ile Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ala Ile Asn  
 1 5 10 15

Asn Arg Gly Gln Cys Lys Thr Cys Thr Thr Thr Ala His Gly Thr Ser  
 20 25 30

Met Tyr Pro Tyr Cys Cys Cys Thr

5/8

35

40

<210> 17  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Hepatitis B virus

&lt;400&gt; 17

Ala Ile Asn Asn Arg  
1 5

<210> 18  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Hepatitis B virus

&lt;400&gt; 18

Ile Pro Gly Ser Ala  
1 5

<210> 19  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Hepatitis B virus

&lt;400&gt; 19

Pro Gly Ser Ala Ile  
1 5

<210> 20  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Hepatitis B virus

&lt;400&gt; 20

Gly Ser Ala Ile Asn  
1 5

<210> 21  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Hepatitis B virus

&lt;400&gt; 21

Ser Ala Ile Asn Asn  
1 5

<210> 22  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Hepatitis B virus

6/8

&lt;400&gt; 22

Ile Asn Asn Arg Gly  
1 5

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Hepatitis B virus

&lt;400&gt; 23

Asn Asn Arg Gly Gln  
1 5

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Hepatitis B virus

&lt;400&gt; 24

Asn Arg Gly Gln Cys  
1 5

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Hepatitis B virus

&lt;400&gt; 25

Arg Gly Gln Cys Lys  
1 5

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Hepatitis B virus

&lt;400&gt; 26

Ala Ile Asn Asn Arg Gly Gln  
1 5

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Hepatitis B virus

&lt;400&gt; 27

Ala Ile Asn Asn Arg Gly Gln Cys Lys  
1 5

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 16

7/8

<212> PRT  
<213> Hepatitis B virus

<400> 28

Ala Ile Asn Asn Arg Gly Gln Cys Lys Thr Cys Thr Thr Thr Ala His  
1 5 10 15

<210> 29  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> Hepatitis B virus

<400> 29

Ala Ile Asn Asn Arg Gly Gln Cys Lys Thr Cys Thr Thr Thr Ala His  
1 5 10 15

Gly Thr Ser Met Tyr Pro Tyr Cys Cys Cys Thr  
20 25

<210> 30  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Hepatitis B virus

<400> 30

Cys Lys Thr Cys Thr Thr Thr Ala His Gly Thr Ser Met Tyr Pro Tyr  
1 5 10 15

Cys Cys Cys Thr  
20

<210> 31  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Primer 1

<400> 31  
gggtcaccat attcttggga ac

22

<210> 32  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Primer 2

<400> 32  
tatacccaaa gacaaaagaa aattgg

26



8/8

<210> 33  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Primer 3

<400> 33  
gactcgtggt ggacttctct c 21

<210> 34  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Primer 4

<400> 34  
tacagacttg gcccacaata cc 22

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/006516

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C07K14/02 G01N33/53 A61K39/29		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, PAJ, WPI Data, EMBASE, MEDLINE, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL Large S protein (fragment) 1 February 1997 (1997-02-01), XP002297050 retrieved from EBI Database accession no. Q96841 abstract	1,2,15, 16,18
X	DATABASE EMBL Hepatitis B virus s gene 27 June 2003 (2003-06-27), XP002297051 retrieved from EBI Database accession no. AB104715 abstract	4,19,22
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  21 September 2004		Date of mailing of the international search report  08/10/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Voigt, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/006516

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL Hepatitis B virus DNA complete sequence 10 July 2000 (2000-07-10), XP002297066 retrieved from EBI Database accession no. AF280817 abstract	4,19,22
X	----- DATABASE EMBL Hepatitis B virus partial S gene 6 January 2001 (2001-01-06), TIGEN: XP002297056 retrieved from EBI Database accession no. AJ297881 abstract	4,19,22
X	----- DATABASE EMBL Hepatitis B virus strain 926h preS2-S protein 6 February 2000 (2000-02-06), XP002297053 retrieved from EBI Database accession no. AF214660 abstract	4,19,22
X	& BORCHANI-CHABCHOUB I ET AL: "Genotyping of Tunisian hepatitis B virus isolates based on the sequencing of preS2 and S regions" MICROBES AND INFECTION, ELSEVIER, PARIS, FR, vol. 2, no. 6, May 2000 (2000-05), pages 607-612, XP002229227 ISSN: 1286-4579	7-11
A	----- CARMAN W F ET AL: "FULMINANT REACTIVATION OF HEPATITIS B DUE TO ENVELOPE PROTEIN MUTANT THAT ESCAPED DETECTION BY MONOCLONAL HBSAG ELISA" LANCET THE, LANCET LIMITED. LONDON, GB, vol. 345, no. 8962, 3 June 1995 (1995-06-03), pages 1406-1407, XP002041203 ISSN: 0140-6736 the whole document	1-22
A	----- WEINBERGER KLAUS M ET AL: "High genetic variability of the group-specific a-determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 81, no. 5, May 2000 (2000-05), pages 1165-1174, XP002297178 ISSN: 0022-1317 the whole document	1-22
	----- -/-	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP2004/006516

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A.	<p>CHIOU H-L ET AL: "Altered antigenicity of 'a' determinant variants of hepatitis B virus"</p> <p>JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, READING, GB, vol. 78, 1997, pages 2639-2645, XP002174817</p> <p>ISSN: 0022-1317</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-22

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2004/006516

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C07K14/02 G01N33/53 A61K39/29		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchiertor Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C07K G01N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, PAJ, WPI Data, EMBASE, MEDLINE, CHEM ABS Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EMBL Large S protein (fragment) 1. Februar 1997 (1997-02-01), XP002297050 gefunden im EBI Database accession no. Q96841 Zusammenfassung	1,2,15, 16,18
X	DATABASE EMBL Hepatitis B virus s gene 27. Juni 2003 (2003-06-27), XP002297051 gefunden im EBI Database accession no. AB104715 Zusammenfassung	4,19,22
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahellegend ist "G" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  21. September 2004		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts  08/10/2004
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Voigt, H

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2004/006516

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE EMBL Hepatitis B virus DNA complete sequence 10. Juli 2000 (2000-07-10), XP002297066 gefunden im EBI Database accession no. AF280817 Zusammenfassung</p>	4,19,22
X	<p>DATABASE EMBL Hepatitis B virus partial S gene 6. Januar 2001 (2001-01-06), TIGEN: XP002297056 gefunden im EBI Database accession no. AJ297881 Zusammenfassung</p>	4,19,22
X	<p>DATABASE EMBL Hepatitis B virus strain 926h preS2-S protein 6. Februar 2000 (2000-02-06), XP002297053 gefunden im EBI Database accession no. AF214660 Zusammenfassung</p>	4,19,22
X	<p>&amp; BORCHANI-CHABCHOUB I ET AL: "Genotyping of Tunisian hepatitis B virus isolates based on the sequencing of preS2 and S regions" MICROBES AND INFECTION, ELSEVIER, PARIS, FR, Bd. 2, Nr. 6, Mai 2000 (2000-05), Seiten 607-612, XP002229227 ISSN: 1286-4579</p>	7-11
A	<p>CARMAN W F ET AL: "FULMINANT REACTIVATION OF HEPATITIS B DUE TO ENVELOPE PROTEIN MUTANT THAT ESCAPED DETECTION BY MONOCLONAL HBSAG ELISA" LANCET THE, LANCET LIMITED. LONDON, GB, Bd. 345, Nr. 8962, 3. Juni 1995 (1995-06-03), Seiten 1406-1407, XP002041203 ISSN: 0140-6736 das ganze Dokument</p>	1-22
A	<p>WEINBERGER KLAUS M ET AL: "High genetic variability of the group-specific a-determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, Bd. 81, Nr. 5, Mai 2000 (2000-05), Seiten 1165-1174, XP002297178 ISSN: 0022-1317 das ganze Dokument</p>	1-22

-/-

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/006516

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>CHIOU H-L ET AL: "Altered antigenicity of 'a' determinant variants of hepatitis B virus"</p> <p>JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, READING, GB, Bd. 78, 1997, Seiten 2639-2645, XP002174817</p> <p>ISSN: 0022-1317</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-22